(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0027888
(43) 공개일자 2024년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/64 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/64 (2017.08)
A61K 47/6455 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2024-7006016(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년12월14일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7020171
원출원일자(국제) 2017년12월14일
심사청구일자 2020년12월11일
(85) 번역문제출일자 2024년02월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/066541
(87) 국제공개번호 WO 2018/112278
국제공개일자 2018년06월21일
(30) 우선권주장
62/434,344 2016년12월14일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
리간달 인코포레이티드
미국 94107 캘리포니아주 샌프란시스코 피프스 스트리트 650 스위트 311
(72) 발명자
왓슨 안드레 로날드
미국 캘리포니아 94107 샌프란시스코 일리노이 스트리트 700 유닛 204
포스터 크리스티안
미국 캘리포니아 94607 오클랜드 캠벨 스트리트 1123
(74) 대리인
양영준, 이상남

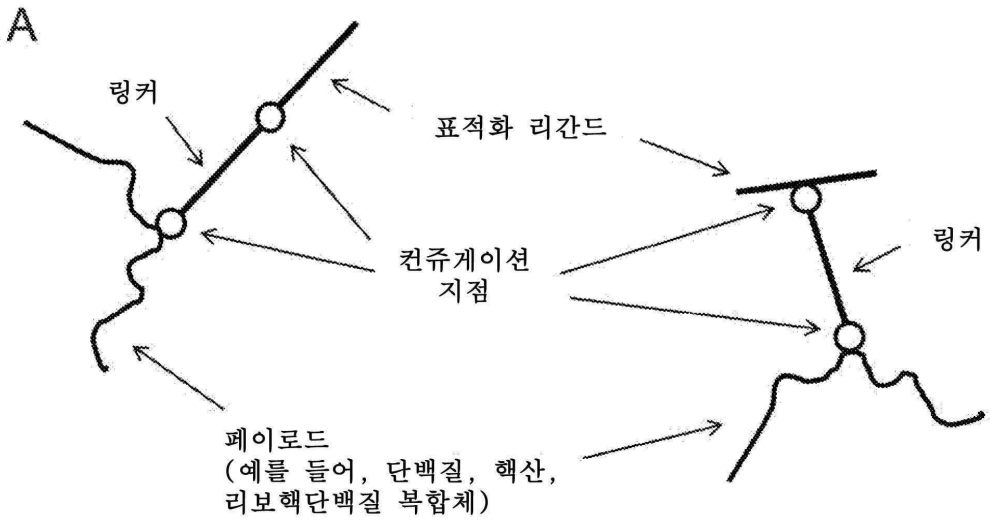
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 및 단백질 페이로드 전달을 위한 방법 및 조성물**

(57) 요 약

핵산, 단백질 및/또는 리보핵단백질 페이로드를 세포에 전달하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 또한, 단백질 또는 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA 분자)에 컨쥬게이션된, 또는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 (예를 들어, 9R과 같은 폴리-아르기닌 또는 6H와 같은 폴리-히스티딘 등)에 컨쥬게이션된 펩티드 표적화 리간드를 포함하는 전달 분자가 제공된다. 표적화 리간드는 (i) 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합, 및 (ii) 긴 엔도좀 재순환 경로의 개입을 제공한다. 이와 같이, 표적화 리간드가 의도된 세포 표면 단백질과 결합하면, 전달 분자는 (예를 들어, 세포내이입을 통해) 세포에 들어가며, 바람직하게는 리소좀 분해 경로로부터 멀어진다.

대 표 도 - 도1a



(30) 우선권주장
62/443,522 2017년01월06일 미국(US)
62/443,567 2017년01월06일 미국(US)
62/517,346 2017년06월09일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

전달 분자의 용도이며,

전달 분자는 단백질 또는 핵산 페이로드(payload)에 컨쥬게이션된, 또는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션된 펩티드 표적화 리간드를 포함하고,

상기 표적화 리간드는 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합을 제공하는 것인 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **상호 참조**

[0002] 본 출원은 2016년 12월 14일자 출원된 미국 가출원 제62/434,344호, 2017년 6월 9일자 출원된 미국 가출원 제62/517,346호, 2017년 1월 6일자 출원된 미국 가출원 제62/443,567호, 및 2017년 1월 6일자 출원된 미국 가출원 제62/443,522호를 우선권 주장하며, 상기 출원들은 모두 그 전문이 본원에 참조로서 인용된다.

[0003] **텍스트 파일로 제공되는 서열 목록의 참조로서의 인용**

[0004] 서열 목록은 2017년 12월 14일자 생성된 크기 54 KB의 텍스트 파일, "LGDL-003 SeqList_ST25.txt"로서 본원에 함께 제공된다. 텍스트 파일의 내용은 그 전체가 본원에 참조로서 인용된다.

배 경 기 술

[0005] **서문**

[0006] 최근 리간드-표적화된 치료제 분야의 진보에도 불구하고, 예를 들어 유전자 치료 적용을 위한 핵산 치료제에 있어서의 세포내 활성 페이로드(payload)의 전달 방법은 여전히 제한적이다. 주요 장애물은 세포내 활성 페이로드를 이의 적절한 세포내 미세환경으로 실어 나르는 것에 관여하는, 주어진 치료 적용에 부합하는 표적화 리간드를 형성하는 능력이다. 일부 연구는 베어 (bare) 핵산 (예를 들어, 간 표적화를 위해 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)에 공유 결합된 화학적으로 변형된 siRNA 분자), 또는 나노입자 기반 약물/유전자 전달 (예를 들어, 전립선 특이적 막 항원 (PSMA)-표적화된 도세탁셀 나노입자)를 위한 고친화성 표적화 기술을 개발하는 것을 목적으로 수행되었다. 하지만, 현재 이용 가능한 방법은, 세포로의 핵산, 단백질 및/또는 리보핵단백질 페이로드의 효과적이며 표적화된 전달에 관여하는 다수의 고려 사항들을 고려하지 않는다. 본 개시는 이러한 관심사를 다루고, 관련 이점을 제공한다.

선행기술문헌

[0007] US 2008/0312410 A1 (2008년 12월 18일 공개)

[0008] US 2013/0137851 A1 (2013년 5월 30일 공개)

[0009] US 2011/0077581 A1 (2011년 3월 31일 공개)

[0010] US 2009/0155289 A1 (2009년 6월18일 공개)

[0011] US 2013/0022538 A1 (2013년 1월 24일 공개)

[0012] US 2007/0254842 A1 (2007년 11월 1일 공개)

발명의 내용

[0013] 핵산, 단백질 및/또는 리보핵단백질 페이로드를 세포에 전달하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 또한, 단백질 또는 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA 분자)에 컨쥬게이션된(conjugated), 또는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 (예를 들어, 9R과 같은 폴리-아르기닌 또는 6H와 같은 폴리-히스티딘 등)에 컨쥬게이션된 펩티드 표적화 리간드를 포함하는 전달 분자가 제공된다. 표적화 리간드는 (i) 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합, 및 (ii) 긴 엔도좀 재순환 경로의 개입(engagement)을 제공한다. 이와 같이, 표적화 리간드가 의도된 세포 표면 단백질과 결합하면, 전달 분자는 (예를 들어, 세포내이입(endocytosis)을 통해) 세포에 들어가며, 바람직하게는 리소좀 분해 경로로부터 멀어진다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합을 제공하지만, 긴 엔도좀 재순환 경로의 개입을 반드시 제공하지는 않는다.

[0014] 일부 경우에서, 표적화 리간드가 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션되는 경우, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 핵산 페이로드, 예컨대 siRNA, 또는 플라스미드 DNA 또는 mRNA와 상호작용한다 (예를 들어, 이와 응축된다). 일부 경우에서, 표적화 리간드가 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션되는 경우, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 단백질 페이로드와 상호작용한다 (예를 들어, 이와 응축된다). 일부 경우에서, 대상 전달 분자의 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 페이로드 (예를 들어, 핵산 및/또는 단백질)와 상호작용하고, 음이온성 중합체와 함께 조성물로 존재한다 (예를 들어, 전달 분자는 페이로드 및 음이온성 중합체 둘 모두와 응축될 수 있다).

[0015] 일부 경우에서, 표적화 리간드가 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션되는 경우, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은, 예를 들어 나노입자의 하전된 안정화 층 (예컨대 실리카, 펩토이드(peptoid), 폴리시스테인 또는 인산칼슘 코팅)과 정전기적으로 상호작용한다.

도면의 간단한 설명

[0016] 본 발명은 첨부된 도면들과 함께 읽을 때 하기 상세한 설명으로부터 가장 잘 이해된다. 통상의 실시에 따라, 도면의 다양한 특징들은 일정한 비율로 축소 또는 확대된 것이 아니라는 점이 강조된다. 반대로, 다양한 특징들의 치수는 명확성을 위해 임의로 확대 또는 축소된 것이다. 도면에는 하기의 그림들이 포함된다.

도 1 (**패널 A-F**)은, 대상 전달 분자의 예시적인 배치 형태의 개략도를 제공한다. 표적화 리간드는 N- 또는 C-말단에서 컨쥬게이션될 수 있지만 (각각의 패널의 좌측), 또한 내부 위치에서 컨쥬게이션될 수도 있다 (각각의 패널의 우측)는 점에 주목한다. 패널 A, C 및 E에서의 분자는 링커를 포함하지만, 패널 B, D 및 F의 분자는 그렇지 않다. (**패널 A-B**) 페이로드에 컨쥬게이션된 표적화 리간드를 포함하는 전달 분자. (**패널 C-D**) 나노입자의 하전된 안정화 층과 정전기적으로 상호작용하는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션된 표적화 리간드를 포함하는 전달 분자. (**패널 E-F**) 핵산 페이로드와 응축된 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션된 표적화 리간드를 포함하는 전달 분자.

도 2 (패널 A-D)는, 대상 전달 분자의 예시적인 배치 형태의 개략도를 제공한다. 도시된 표적화 리간드는 엑센딘(exendin) (S11C 치환을 가짐)이다 ((서열 번호 2) 참조). 링커 유무 하에서, 컨쥬게이션에 의한 (링커를 통한), 나노입자의 하전된 안정화 층 ("음이온성 나노입자 표면")과 정전기적으로 상호작용하는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 대한 상이한 컨쥬게이션 화학의 예가 제시된다. 도 2의 패널 A는, 환원성으로 절단 가능한 (reducibly-cleavable) 디술파이드 결합을 통해 핵산, 단백질 또는 리보핵단백질에 컨쥬게이션된, 엑센딘-4 (1-39) [Cys11] (서열 번호 2)의 컨쥬게이션 전략의 예를 제공한다. 도 2의 패널 B는, 아민-반응성 결합을 통해 핵산, 단백질 또는 리보핵단백질에 컨쥬게이션된, 엑센딘-4 (1-39) [Cys11]의 컨쥬게이션 전략의 예를 제공한다. 도 2의 패널 C는, (아민-반응성 도메인을 통해) 핵산, 단백질 또는 리보핵단백질에 컨쥬게이션되는, 환원성으로 절단 가능한 디술파이드 결합을 통해 링커에 컨쥬게이션된, 엑센딘-4 (1-39) [Cys11]의 컨쥬게이션 전략의 예를 제공한다. 도 2의 패널 D는, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션되고 (9R 서열이 도시됨), 이어서 나노입자의 하전된 안정화 층 (예를 들어, 실리카, 펩토이드, 폴리시스테인 또는 인산칼슘 코팅)과 정전기적으로 상호작용함으로써 나노입자 표면을 코팅하는, 환원성으로 절단 가능한 디술파이드 결합을 통해 링커에 컨쥬게이션된, 엑센딘-4 (1-39) [Cys11]의 컨쥬게이션 전략의 예를 제공한다.

도 3은, 예를 들어 알로스테릭(allosteric)/친화성 N-말단 도메인 및 오르토스테릭(orthosteric) 엔도좀 분류/신호전달 도메인에 대한 결합에 대하여, 표적화 리간드를 평가하는 경우에 고려되어야 하는 개별 도메인을 강조하는, 패밀리 B GPCR의 잔기 170-432 (서열 번호 178)의 개략도를 제공한다 (도면은 [Siu, Fai Yiu, et al., Nature 499.7459 (2013): 444-449]로부터 취한 것임).

도 4는, 친화성이 유지되며, 표적화 리간드가 핵산 방출을 촉진하고 핵산 분해를 제한하는 긴 엔도좀 재순환 경

로에 개입하도록, 표적화 리간드에 대한 (예를 들어, 시스테인 잔기로의) 삽입 및/또는 치환을 위한 내부 아미노산 위치를 동정하는 예를 제공한다. 이러한 경우, 표적화 리간드는 엑센딘-4이고, 아미노산 위치 10, 11 및 12가 (예를 들어, 시스테인 잔기, 예를 들어 S11C 돌연변이로의) 가능한 삽입 및/또는 치환을 위한 부위로서 동정되었다. 도면은 3-차원 공간에서 회전하였던 PDB 렌더링(rendering), 및 글루카곤-GCGR (4ERS) 및 GLP1-GLP1R-ECD 복합체 (PDB: 3IOL)의 공지된 결정 구조에 대하여 시뮬레이션된 엑센딘-4 S11C (서열 번호 2)의 정렬을 나타낸다.

도 5는, 3원 FGF2-FGFR1-헤파린 복합체의 일부로서의 tbFGF 단편 (서열 번호 179) (PDB 상의 1fq9)을 나타낸다. CKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (강조 표시됨) (서열 번호 43)가 FGFR1에 대한 친화성에 있어서 중요하다고 결정되었다.

도 6은, FGF (서열 번호 180) 유래의 HFKDPK (서열 번호 5)가 리간드-수용체 오르토스테릭 활성 및 친화성을 위해 사용될 수 있는 펩티드인지를 결정하는데 사용된, 정렬 및 PDB 3D 렌더링을 제공한다.

도 7은, FGF 단편 (서열 번호 181) 유래의 LESNNYNT (서열 번호 6)가 리간드-수용체 오르토스테릭 활성 및 친화성을 위해 사용될 수 있는 펩티드인지를 결정하는데 사용된, 정렬 및 PDB 3D 렌더링을 제공한다.

도 8은, 페이로드가 펩티드 핵산 (PNA) 결합 부위를 갖는 VWF-EGFP pDNA인 경우의 나노입자 상에서의 응축 곡선을 제공한다.

도 9는, 페이로드가 HBB gRNA와 복합체화된 NLS-CAS9-NLS RNP인 경우의 나노입자 상에서의 응축 곡선을 제공한다.

도 10은, 페이로드가 HBB gRNA인 경우의 나노입자 상에서의 응축 곡선을 제공한다.

도 11은, 페이로드가 HBB gRNA인 경우의 나노입자 상에서의 응축 곡선을 제공한다.

도 12는, 페이로드가 HBB gRNA와 복합체화된 NLS-CAS9-NLS RNP인 경우의 나노입자 상에서의 응축 곡선을 제공한다.

도 13은, 페이로드가 펩티드 핵산 (PNA) 결합 부위를 갖는 VWF-EGFP pDNA인 경우의 나노입자 상에서의 응축 곡선을 제공한다.

도 14는, 페이로드가 펩티드 핵산 (PNA) 결합 부위를 갖는 VWF-EGFP pDNA인 경우의 나노입자 상에서의 응축 곡선을 제공한다.

도 15는, 페이로드가 HBB gRNA를 갖는 NLS-CAS9-NLS의 RNP인 경우의 나노입자 상에서의 응축 곡선을 제공한다.

도 16은, 페이로드가 펩티드 핵산 (PNA) 결합 부위를 갖는 VWF-EGFP pDNA인 경우의 나노입자 상에서의 응축 곡선을 제공한다.

도 17은, 페이로드가 Cy5_EGFP mRNA인 경우의 나노입자 상에서의 응축 곡선을 제공한다.

도 18은, 페이로드가 BLOCK-iT Alexa Fluor 555 siRNA인 경우의 나노입자 상에서의 응축 곡선을 제공한다.

도 19는, 페이로드가 HBB gRNA와 복합체화된 NLS-Cas9-EGFP RNP인 경우의 나노입자 상에서의 응축 곡선을 제공한다.

도 20은, 페이로드로서 Alexa 555 Block-IT siRNA와 나노입자를 사용한 경우의 수집된 데이터를 제공한다.

도 21은, 페이로드로서 NLS-Cas9-GFP 및 HBB 가이드 RNA에 의해 형성된 리보핵단백질 (RNP)과 나노입자를 사용한 경우의 수집된 데이터를 제공한다.

도 22는, 페이로드로서 Cy5 EGFP mRNA와 나노입자를 사용한 경우의 수집된 데이터를 제공한다.

도 23은, 페이로드로서 Cy5 태깅된 펩티드 핵산 (PNA) 결합 부위를 갖는 VWF-EGFP pDNA와 나노입자를 사용한 경우의 수집된 데이터를 제공한다.

도 24는, RNP에의 양이온성 폴리펩티드 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C 이어서 PLE100의 첨가, 및 양이온성 폴리펩티드의 추가 첨가에 의한 형광 강도 감소를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정의 데이터를 제공한다.

도 25는, siRNA 및 SYBR Gold에의 양이온성 폴리펩티드 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C 이어서 PLE100의 첨가, 및 양이온성 폴리펩티드의 추가 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정의 데이터를 제공한

다.

도 26은, HBB gRNA 및 SYBR Gold를 갖는 NLS-Cas9-EGFP의 RNP에의, 양이온성 폴리펩티드 히스톤 펩티드 H2A 이어서 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C의 첨가, 및 PLE100의 추가 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정의 데이터를 제공한다.

도 27은, HBB gRNA 및 SYBR Gold를 갖는 NLS-Cas9-EGFP의 RNP에의, CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C와 함께인 양이온성 폴리펩티드 히스톤 펩티드 H4의 첨가, 및 PLE100의 추가 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정의 데이터를 제공한다.

도 28은, mRNA에의 양이온성 폴리펩티드 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C의 첨가, 및 PLE100의 추가 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정의 데이터를 제공한다.

도 29는, mRNA에의 히스톤 H4의 첨가, 및 CD45-mSiglec-(4GS)2_9R_c 및 PLE100의 추가 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정의 데이터를 제공한다.

도 30은, mRNA에의 히스톤 H2A의 첨가, 및 CD45-mSiglec-(4GS)2_9R_c 및 PLE100의 추가 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정의 데이터를 제공한다.

도 31은, 양이온성 폴리펩티드 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C 이어서 PLE100의 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, VWF_EGFP pDNA로의 인터칼레이션(intercalation)으로부터의 SYBR Gold 배제 검정의 데이터를 제공한다.

도 32는, 히스톤 H4, 이어서 양이온성 폴리펩티드 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C, 이어서 PLE100의 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, VWF_EGFP pDNA로의 인터칼레이션으로부터의 SYBR Gold 배제 검정의 데이터를 제공한다.

도 33은, 히스톤 H4, 이어서 양이온성 폴리펩티드 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C, 이어서 PLE100의 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, VWF_EGFP pDNA로의 인터칼레이션으로부터의 SYBR Gold 배제 검정의 데이터를 제공한다.

도 34 (패널 A-C)는, 폴리플렉스(polyplex) 크기 분포, 실리카 코팅된 크기 및 제타 전위 분포, 및 리간드 코팅된/관능화된 입자 크기 및 제타 전위 분포에 관한 데이터를 제공한다.

도 35는, 분지형 히스톤 펩티드 컨쥬게이트 파일럿 입자에 관한 데이터를 제공한다.

도 36은, 프로젝트 HSC.001.001 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 37은, 프로젝트 HSC.001.002 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 38은, 프로젝트 HSC.002.01 (표적화 리간드 - ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N) (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 39는, 프로젝트 HSC.002.02 (표적화 리간드 - ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_C) (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 40은, 프로젝트 HSC.002.03 (표적화 리간드 - CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C) (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 41은, 프로젝트 HSC.002.04 (표적화 리간드 - Cy5mRNA-SiO2-PEG) (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 42는, 프로젝트 BLOOD.002.88 (표적화 리간드 - CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C) (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 43은, 프로젝트 BLOOD.002.89 (표적화 리간드 - CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C) (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 44는, 프로젝트 BLOOD.002.90 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 45는, 프로젝트 BLOOD.002.91 (PLR50) (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 46은, 프로젝트 BLOOD.002.92 (표적화 리간드 - CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C) (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 47은, 프로젝트 TCELL.001.1 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 48은, 프로젝트 TCELL.001.3 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 49는, 프로젝트 TCELL.001.13 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 50은, 프로젝트 TCELL.001.14 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 51은, 프로젝트 TCELL.001.16 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 52는, 프로젝트 TCELL.001.18 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 53은, 프로젝트 TCELL.001.28 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 54는, 프로젝트 TCELL.001.29 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 55는, 프로젝트 TCELL.001.31 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 56은, 프로젝트 TCELL.001.33 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 57은, 프로젝트 TCELL.001.43 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 58은, 프로젝트 TCELL.001.44 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 59는, 프로젝트 TCELL.001.46 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 60은, 프로젝트 TCELL.001.48 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 61은, 프로젝트 TCELL.001.58 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 62는, 프로젝트 TCELL.001.59 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 63은, 프로젝트 CYNOBM.002.82 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 64는, 프로젝트 CYNOBM.002.83 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 65는, 프로젝트 CYNOBM.002.84 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 66은, 프로젝트 CYNOBM.002.85 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 67은, 프로젝트 CYNOBM.002.86 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 68은, 프로젝트 CYNOBM.002.76 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 69는, 프로젝트 CYNOBM.002.77 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 70은, 프로젝트 CYNOBM.002.78 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 71은, 프로젝트 CYNOBM.002.79 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 72는, 프로젝트 CYNOBM.002.80 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 73은, CynoBM.002 샘플에 대한 비트랜스펙션된(untransfected) 대조군에 관한 데이터를 제공한다.

도 74는, NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP의 리포펙타민(lipofectamine) CRISPRMAX 전달에 관한 데이터를 제공한다.

도 75는, 프로젝트 CynoBM.002 RNP-Only 대조군 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 76은, 프로젝트 CynoBM.002.82 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 77은, 프로젝트 CynoBM.002.83 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 78은, 프로젝트 CYNOBM.002.84 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 79는, 프로젝트 CynoBM.002.85 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 80은, 프로젝트 CynoBM.002.86 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 81은, 프로젝트 CynoBM.002.75 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 82는, 프로젝트 CynoBM.002.76 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 83은, 프로젝트 CynoBM.002.77 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 84는, 프로젝트 CynoBM.002.78 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 85는, 프로젝트 CynoBM.002.79 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 86은, 프로젝트 CynoBM.002.80 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 87은, 프로젝트 CynoBM.002.81 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 88은, CynoBM.002 RNP-Only 대조군의 정성적 이미지를 제공한다.

도 89는, 프로젝트 HSC.004 (표 4 참조) 고함량 스크리닝(high-content screening)에 관한 데이터를 제공한다.

도 90은, 프로젝트 TCELL.001 (표 4 참조) 고함량 스크리닝에 관한 데이터를 제공한다.

도 91은, 프로젝트 TCELL.001 (표 4 참조) 리포펙타민 CRISPRMAX 대조군에 관한 데이터를 제공한다.

도 92는, 프로젝트 TCell.001.1 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 93은, 프로젝트 TCell.001.2 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 94는, 프로젝트 TCell.001.3 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 95는, 프로젝트 TCell.001.4 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 96은, 프로젝트 TCell.001.5 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 97은, 프로젝트 TCell.001.6 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 98은, 프로젝트 TCell.001.7 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 99는, 프로젝트 TCell.001.8 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 100은, 프로젝트 TCell.001.9 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 101은, 프로젝트 TCell.001.10 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 102는, 프로젝트 TCell.001.11 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 103은, 프로젝트 TCell.001.12 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 104는, 프로젝트 TCell.001.13 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 105는, 프로젝트 TCell.001.14 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 106은, 프로젝트 TCell.001.15 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 107은, 프로젝트 TCell.001에 대한 음성 대조군 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 108은, 프로젝트 Blood.002 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 109는, 프로젝트 TCell.001.27 (표 4 참조)에 관한 데이터를 제공한다.

도 110은, 음이온성 또는 양이온성 펩티드/물질이 단백질 표면 상에 안정한 하전된 층을 형성하기 위해 첨가되어야 하는지 여부를 결정하는 것을 가능하게 하는, CRISPR RNP (가능한 페이로드)의 전하 밀도 플롯을 도시한다.

도 111은, 음이온성 또는 양이온성 펩티드/물질이 단백질 표면 상에 안정한 하전된 층을 형성하기 위해 첨가되어야 하는지 여부를 결정하는 것을 가능하게 하는, 슬리핑 뷰티 트랜스포존 (Sleeping Beauty Transposon) (가능한 페이로드)의 전하 밀도 플롯을 도시한다.

도 112는, (1) CRISPR RNP 표면 상의 양이온성 부위에 대한 예시적인 음이온성 펩티드 (9-10개의 아미노산 길이, 약 10nm 직경 CRISPR RNP로 조정) 앵커링, 이후 (2) (2a) 앵커-링커-리간드 또는 독립형 양이온성 앵커로서의, (2b) 후속 다층화 화학, 다수의 핵산 또는 하전된 치료제의 동시 전달, 또는 가교 결합을 통한 층 안정화의 부가 유무 하에서의, 양이온성 앵커의 첨가를 도시한다.

도 113은, Cas9 RNP, 또는 임의의 동종으로 또는 쯔비터이온성으로(zwitterionically) 하전된 표면을 포함할 수 있는 코어 템플릿을 기반으로 하는 정전기적 매트릭스 조성물, 및 첨가 순서의 예를 도시한다.

도 114는, IL2R에 결합된 IL2의 모델화된 구조를 제공한다.

도 115는, 단쇄 CD3 항체 단편의 모델화된 구조를 제공한다.

도 116은, N-아세틸뉴라민산 (Neu5Ac)과의 복합체에서의 시알로어드헤신(sialoadhesin) N-말단의 모델화된 구조를 제공한다.

도 117은, 줄기 세포 인자 (SCF)의 모델화된 구조를 제공한다.

도 118은, cKit 수용체 단편의 합리적 설계 동안 생성된 이미지의 예를 제공한다.

도 119는, cKit 수용체 단편의 합리적 설계 동안 생성된 이미지의 예를 제공한다.

도 120은, cKit 수용체 단편의 합리적 설계 동안 생성된 이미지의 예를 제공한다.

도 121은, 합리적으로 설계된 cKit 수용체 단편을 분석한 것으로부터의 원형 이색성 데이터를 제공한다.

도 122는, 합리적으로 설계된 cKit 수용체 단편의 안정화된 입체구조의 모델링을 도시한다.

도 123은, HTP가 양이온성 중합체 백본(backbone)의 측쇄에 컨쥬게이션된 분지형 히스톤 구조의 예를 도시한다. 우측의 중합체는 전구체 백본 분자를 나타내고, 좌측의 분자는 분지형 구조의 분절의 예이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 상기 요약된 바와 같이, 핵산, 단백질 및/또는 리보핵단백질 페이로드를 세포에 전달하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 제공된 전달 분자는, 단백질 또는 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA 분자)에 컨쥬게이션된, 또는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 (예를 들어, 9R과 같은 폴리-아르기닌 또는 6H와 같은 폴리-히스티딘 등)에 컨쥬게이션된 펩티드 표적화 리간드를 포함한다. 표적화 리간드는, (i) 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합, 및 (ii) 긴 엔도좀 재순환 경로의 개입을 제공한다.

[0018] 본 발명의 방법 및 조성물을 기재하기 전, 본 발명이 기재된 특정 방법 또는 조성물에 제한되지 않으며, 당연히 가변적일 수 있다는 것을 이해해야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 구현예를 설명하기 위한 목적이며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이기 때문에, 제한하고자 하는 것이 아니라는 것을 이해해야 한다.

[0019] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 그 범위의 상한과 하한 사이에서, 하한 단위의 1/10까지의 각각의 사이에 있는 값이 또한 구체적으로 개시된다는 것을 이해해야 한다. 언급된 범위에서 임의의 언급 값 또는 사이에 있는 값과, 상기 언급된 범위에서 임의의 다른 언급된 또는 사이에 있는 값 사이의 각각의 보다 작은 범위는, 본 발명에 포함된다. 이러한 보다 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 범위 내 포함되거나 배제될 수 있으며, 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 한계를 조건으로, 양쪽 한계 중 어느 하나, 둘 모두가 보다 작은 범위에 포함되거나 둘 모두 포함되지 않는 각각의 범위도 또한 본 발명에 포함된다. 언급된 범위가 양쪽 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 포함된 한계 중 하나 또는 둘 모두를 배제하는 범위 또한 본 발명에 포함된다.

[0020] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 일부 가능성이 있는 바람직한 방법 및 물질이 이제 기재된다. 본원에 언급된 모든 출판물은, 그러한 출판물이 인용된 바와 관련하여, 방법 및/또는 물질을 개시 및 기재하기 위해 본원에 참조로서 인용된다. 본 개시는, 모순이 존재하는 범위까지 인용된 출판물의 임의의 개시를 대체하는 것으로 이해된다.

[0021] 본 개시를 읽을 때 당업자에게 명백할 수 있는 바와 같이, 본원에 기재 및 예시된 개별 구현예는 각각, 본 발명의 범위 또는 의미에서 벗어나지 않는 한, 다른 몇몇 구현예의 임의의 특징으로부터 쉽게 분리되거나 이와 조합될 수 있는 별개의 구성요소 및 특징을 갖는다. 임의의 인용된 방법은 인용된 사건의 순서대로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 수행될 수 있다.

[0022] 본원 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바, 단수 형태의 표현은, 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 복수의

언급 대상을 포함한다는 것에 유의해야 한다. 따라서, 예를 들어 "세포"에 대한 언급은 복수의 그러한 세포를 포함하고, "엔도뉴클레아제"에 대한 언급은 하나 이상의 엔도뉴클레아제 및 당업자에 공지된 이의 등가물 등에 대한 언급을 포함한다. 나아가, 청구범위는 임의의 요소, 예를 들어 임의의 임의적 요소를 배제하도록 작성될 수 있다는 점에 유의해야 한다. 이와 같이, 이러한 설명은 청구 요소의 인용 또는 "부정적인" 제한의 사용과 관련하여 "단독으로", "오로지" 등과 같은 배타적인 용어의 사용에 대한 선행 기준으로서 역할을 하기 위한 것이다.

[0023] 본원에 논의된 출판물은 본 출원의 출원일 이전에 개시된 것만 제공된다. 본원의 어떤 것도 본 발명이 그러한 출판물에 앞서 있을 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로서 해석되어서는 안된다. 나아가, 제공된 출판물의 날짜는 실제 공개 날짜와 상이할 수 있으며, 이는 독자적으로 확인해야할 필요가 있을 수 있다.

[0024] **방법 및 조성물**

[0025] 세포내이입되면, 막관통 세포 표면 단백질은 적어도 2개의 상이한 경로에 의해 세포 표면으로 되돌아갈 수 있다: "짧은 사이클"을 통한 엔도좀 분류로부터 직접적으로, 또는 "긴 사이클"을 구성하는 핵주변 재순환 엔도좀을 간접적으로 가로질러. 따라서, 엔도좀 구획으로부터, 적어도 3개의 다양한 경로가 상이한 목적지로 갈라진다: 리소좀 (분해적 경로), 핵주변 재순환 구획 ('긴 사이클'; 또는 '긴', '간접적인' 또는 '느린' 엔도좀 재순환 경로), 또는 원형질 막에 직접적으로 ('짧은 사이클'; 또는 '짧은', '직접적인' 또는 '빠른' 엔도좀 재순환 경로). 지금까지는, 효과적인 전달, 및 예를 들어 세포 내 핵산의 발현을 매개하는데 적절한 표적화 리간드를 선택하는데 있어서, (a) 결합 친화성, (b) 신호전달 편향(bias) / 기능 선택성, 및 (c) 특정 엔도좀 분류 경로의 조합된 역할에 주의를 기울이지 않았다.

[0026] 단백질 또는 핵산 페이로드에 컨쥬게이션된, 또는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션된 펩티드 표적화 리간드를 포함하는 전달 분자가 제공된다. 표적화 리간드는, (i) 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합, 및 (ii) 긴 엔도좀 재순환 경로의 개입을 제공한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드가 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션되는 경우, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 핵산 페이로드와 상호작용한다 (예를 들어, 이와 응축된다). 일부 경우에서, 표적화 리간드는 개재(intervening) 링커를 통해 컨쥬게이션된다. 상이한 가능한 컨쥬게이션 전략 (즉, 대상 전달 분자의 구성요소의 상이한 가능한 배열)의 예로서 도 1 및 도 2를 참조한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합을 제공하지만, 긴 엔도좀 재순환 경로의 개입을 반드시 제공하지는 않는다. 따라서, 단백질 또는 핵산 페이로드에 컨쥬게이션된, 또는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션된 펩티드 표적화 리간드를 포함하며, 여기서 표적화 리간드가 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합을 제공하는 (하지만, 긴 엔도좀 재순환 경로의 개입을 반드시 제공하지는 않는) 전달 분자가 또한 제공된다.

[0027] 일부 경우에서, 본원에 개시된 전달 분자는, 핵산 또는 단백질 페이로드가 (예를 들어, 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합을 제공함으로써) 이의 세포외 표적에 도달하여, 바람직하게는 리소좀 내에서 파괴되거나, '짧은' 엔도좀 재순환 엔도좀으로 격리되지 않도록 설계된다. 대신, 본 개시의 전달 분자는, 엔도좀 탈출 및/또는 세포소기관과의 엔도좀 융합을 가능하게 할 수 있는, '긴' (간접적인/느린) 엔도좀 재순환 경로의 개입을 제공할 수 있다.

[0028] 예를 들어, 일부 경우에서, β-아레스틴은 액틴 세포골격으로부터 (예를 들어, 세포내이입 동안) 단일-막관통 수용체 티로신 키나아제 (RTK) 및/또는 7개-막관통 GPCR ([McGovern et al., Handb Exp Pharmacol. 2014;219:341-59]; [Goodman et al., Nature. 1996 Oct 3;383(6599):447-50]; [Zhang et al., J Biol Chem. 1997 Oct 24;272(43):27005-14])의 절단을 매개하는데 개입하여, 목적하는 엔도좀 분류 경로를 촉발시킨다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 개시의 전달 분자의 표적화 리간드는 세포 표면 단백질에의 결합 시 (예를 들어, 신호전달 편향을 제공하고, 오르토스테릭 결합 후 세포내이입을 통해 내재화를 촉진시키는) β-아레스틴의 개입을 제공한다.

[0029] *표적화 리간드*

[0030] 다양한 표적화 리간드가 대상 전달 분자의 일부로서 사용될 수 있으며, 다수의 상이한 표적화 리간드가 구상된다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 야생형 단백질의 단편 (예를 들어, 결합 도메인)이다. 예를 들어, 대상 전달 분자의 펩티드 표적화 리간드는 4-50개의 아미노산 (예를 들어, 4-40, 4-35, 4-30, 4-25, 4-20, 4-15, 5-50, 5-40, 5-35, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 7-50, 7-40, 7-35, 7-30, 7-25, 7-20, 7-15, 8-50, 8-40, 8-35, 8-30, 8-25, 8-20 또는 8-15개의 아미노산) 길이를 가질 수 있다. 표적화 리간드는 야생형 단백질의 단편일 수

있지만, 일부 경우에서는, 야생형 아미노산 서열에 대한 돌연변이 (예를 들어, 삽입, 결실, 치환) (즉, 상응하는 야생형 단백질 서열에 대한 돌연변이)를 갖는다. 예를 들어, 표적화 리간드는 표적 세포 표면 단백질과의 결합 친화성을 증가 또는 감소시키는 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0031] 일부 경우에서, 표적화 리간드는, 링커, 단백질 또는 핵산 페이로드, 및/또는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에의 컨쥬게이션에 대한 전략을 가능하게 할 수 있는, 시스테인 잔기를 부가하는 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, 시스테인은 술프히드릴(sulfhydryl) 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 및/또는 아민-반응성 (amine-reactive) 화학을 통해 핵산 (예를 들어, siRNA) 및 단백질에의 가교결합 (컨쥬게이션)에 사용될 수 있다.

[0032] 일부 경우에서, 표적화 리간드는 내부 시스테인 잔기를 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 N- 및/또는 C- 말단에 시스테인 잔기를 포함한다. 일부 경우에서, 시스테인 잔기를 포함하기 위해, 표적화 리간드는 상응하는 야생형 서열에 대하여 돌연변이 (예를 들어, 삽입 또는 치환)된다. 이와 같이, 본원에 기재된 임의의 표적화 리간드는, 시스테인 잔기를 사용하여 상기 삽입 및/또는 치환 중 임의의 것 (예를 들어, 시스테인 잔기의 내부, N-말단, C-말단 삽입, 또는 시스테인 잔기로의 치환)으로 변형될 수 있다.

[0033] "상응하는" 야생형 서열은, 대상 서열이 유도된 또는 유도될 수 있는 야생형 서열 (예를 들어, 관심 서열에 대하여 높은 서열 동일성을 갖는 야생형 단백질 서열)을 의미한다. 예를 들어, 하나 이상의 돌연변이 (예를 들어, 치환, 삽입)를 갖지만, 그 외에는 야생형 서열과 매우 유사한 표적화 리간드의 경우, 가장 유사한 아미노산 서열은 상응하는 야생형 아미노산 서열인 것으로 간주될 수 있다.

[0034] 상응하는 야생형 단백질/서열은 100% 동일할 필요는 없지만 (변형된 위치(들) 이외) (예를 들어, 85% 이상 동일, 90% 이상 동일, 95% 이상 동일, 98% 이상 동일, 99% 이상 등 동일할 수 있음), 표적화 리간드 및 상응하는 야생형 단백질 (예를 들어, 야생형 단백질의 단편)은 의도된 세포 표면 단백질과 결합할 수 있고, 이들이 상동성인 것으로 간주될 수 있는 (변형된 영역 이외) 충분한 서열 동일성을 보유할 수 있다. "상응하는" 야생형 단백질 서열의 아미노산 서열은 임의의 편리한 방법을 사용하여 (예를 들어, BLAST, MUSCLE, T-COFFEE 등과 같은 임의의 편리한 서열 비교/정렬 소프트웨어를 사용하여) 동정/평가될 수 있다.

[0035] 대상 전달 분자의 일부로서 사용될 수 있는 표적화 리간드의 예에는, 비제한적으로, 표 1에 열거된 것들이 포함된다. 대상 전달 분자의 일부로서 사용될 수 있는 표적화 리간드의 예에는, 비제한적으로, 표 2에 열거된 것들이 포함된다 (표 2에 열거된 서열의 다수는 링커 (예를 들어, GGGGSGGGGS (서열 번호 146))를 통해 양이온성 폴리펩티드 도메인, 예를 들어 9R, 6R 등에 컨쥬게이션된 표적화 리간드 (예를 들어, 2열의 SNRWLDVK (서열 번호 172))를 포함함). 표적화 리간드에 포함될 수 있는 아미노산 서열의 예에는, 비제한적으로, NPKLTRMLTFKFY (서열 번호 173) (IL2), TSVGKYPNTGYYGD (서열 번호 174) (CD3), SNRWLDVK (Siglec) (서열 번호 172), EKFILKVRPAFKAV (서열 번호 175) (SCF); SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (서열 번호 176) (cKit), 및 Ac-SNYSAibADKAibANAibADDAibAEAibAKENS (서열 번호 177) (cKit)가 포함된다. 따라서, 일부 경우에서, 표적화 리간드는 NPKLTRMLTFKFY (서열 번호 173) (IL2), TSVGKYPNTGYYGD (서열 번호 174) (CD3), SNRWLDVK (Siglec) (서열 번호 172), EKFILKVRPAFKAV (서열 번호 175) (SCF); 또는 SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (서열 번호 176) (cKit)와 85% 이상 (예를 들어, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

표 1

표 1. 표적화 리간드의 예

세포 표면 단백질	표적화 리간드	서열	서열번호
패밀리 B GPCR	엑센딘	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	1
	엑센딘 (S11C)	HGEGTFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	2
FGF 수용체	FGF 단편	KRLYCKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVVSIKGVCANRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFFFERLESNNYNTY	3
	FGF 단편	KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS	4
	FGF 단편	HFKDPK	5
	FGF 단편	LESNNYNT	6
	E-셀렉틴	MIASQFLSALTLVLLIKESGA	7
	L-셀렉틴	MVFPWRCEGTYWGSRNILKLWVWTLLCCDFLIHHGTHC	8
		MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCCDFLAHHGTDC	9
		MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCC	10
트랜스페린 수용체	트랜스페린 리간드	THRPPMWSPVWP	11
α5β1 인테그린	α5β1 리간드	RRETAWA	12
	α5β1 리간드	RGD	

[0036]

[0037] 대상 전달 분자의 표적화 리간드는, 아미노산 서열 RGD 및/또는 서열 번호 1-12 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열과 85% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 대상 전달 분자의 표적화 리간드는 아미노산 서열 RGD 및/또는 서열 번호 1-12 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 대상 전달 분자의 표적화 리간드는 시스테인 (내부, C-말단 또는 N-말단)을 포함할 수 있고, 또한 아미노산 서열 RGD 및/또는 서열 번호 1-12 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열과 85% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0038] 용어 "표적" 및 "표적화된 결합"은, 특이적 결합을 나타내는 것으로 본원에서 사용된다. 용어 "특이적 결합", "특이적으로 결합하다" 등은, 용액 또는 반응 혼합물 중 다른 분자 또는 모이어티(moiety)에 비해 한 분자에 대한 비(非)공유적 또는 공유적인 우선적 결합을 나타낸다 (예를 들어, 다른 이용 가능한 폴리펩티드에 비해 특정한 폴리펩티드 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체, 다른 이용 가능한 수용체에 비해 특정한 수용체에 특이적으로 결합하는 리간드). 일부 구현예에서, 한 분자의, 이에 특이적으로 결합하는 또 다른 분자에 대한 친화성은, 10^{-5} M 이하 (예를 들어, 10^{-6} M 이하, 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 10^{-10} M 이하, 10^{-11} M 이하, 10^{-12} M 이하, 10^{-13} M 이하, 10^{-14} M 이하, 10^{-15} M 이하 또는 10^{-16} M 이하)의 K_d (해리 상수)에 의해 특징지어 진다. "친화성"은 결합의 강도를 나타내며, 증가된 결합 친화성은 보다 낮은 K_d와 상관관계가 있다.

[0039] 일부 경우에서, 표적화 리간드는, 패밀리 B G-단백질 연결 수용체 (GPCR), 수용체 티로신 키나아제 (RTK), 세포 표면 당단백질 및 세포-세포 부착 분자로부터 선택되는 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합을 제공한다. 수용체 도킹(docking) 시 리간드의 공간 배열에 대한 고려는, 예를 들어 리간드와 표적 사이의 구조 기능 관계

가 페이로드 또는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에의 표적화 리간드의 컨쥬게이션으로 인해 붕괴되지 않도록, 적절한 목적하는 기능 선택성 및 엔도좀 분류 편향을 달성하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 핵산, 단백질, 리보핵단백질 또는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에의 컨쥬게이션은, 잠재적으로 결합 틈(cleft)(들)에 지장을 줄 수 있다.

[0040] 따라서, 일부 경우에서, 리간드에 결합된 목적하는 표적 (세포 표면 단백질)의 결정 구조가 이용 가능한 경우 (또는 이러한 구조가 관련 단백질에 대하여 이용 가능한 경우), 리간드와 표적 사이의 상호작용 부위를 가시화하기 위해 3D 구조 모델링 및 서열 스레딩(threading)을 사용할 수 있다. 이는, 예를 들어 (예를 들어, 시스테인 잔기)의 치환 및/또는 삽입의 배치를 위한 내부 부위의 선택을 가능하게 할 수 있다.

[0041] 예로서, 일부 경우에서, 표적화 리간드는 패밀리 B G-단백질 연결 수용체 (GPCR) (또한 '세크레틴-패밀리'로도 공지됨)에 대한 결합을 제공한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 표적화된 결합 및 긴 엔도좀 재순환 경로의 개입을 각각 제공하기 위해, 패밀리 B GPCR의 알로스테릭-친화성 도메인 및 오르토스테릭 도메인 둘 모두에 대한 결합을 제공한다 (예를 들어, 하기 실시예 부분, 및 도 3 및 도 4 참조).

[0042] G-단백질 연결 수용체 (GPCR)는, 시클릭 AMP, 이노시톨 포스페이트, 디아실글리세롤 및 칼슘 이온과 같은 세포 내 제2 메신저의 합성을 조절하기 위해 G 단백질 (이종삼량체 GTPase)과 상호작용한다는 점에서, 공통 분자 구조 (7개로 추정되는 막관통 분절 포함) 및 공통의 신호전달 메커니즘을 공유한다. GPCR의 패밀리 B (세크레틴-수용체 패밀리 또는 '패밀리 2')는 작지만, 원형질 막에서 세포간 상호작용을 매개하는 것으로 여겨지는 폴리펩티드 호르몬 및 분자에 대한 수용체를 포함하는, 구조적으로 및 기능적으로 다양한 단백질의 군이다 (예를 들어, [Harmar et al., Genome Biol. 2001;2(12):REVIEWS3013] 참조). 결합된 리간드의 유무 하에서의 N-말단의 몇몇 결정 구조의 공개를 포함하여, 세크레틴-수용체 패밀리의 구성원과 관련하여 구조 생물학에서 중요한 진보가 있었으며, 이러한 연구는 리간드 결합에 대한 이해를 확장시키고, 구조-기반 리간드 설계에 대한 유용한 플랫폼을 제공한다 (예를 들어, [Poyner et al., Br J Pharmacol. 2012 May;166(1):1-3] 참조).

[0043] 예를 들어, 엑센딘-4 리간드, 또는 이의 유도체를 사용하여 췌장 세포 표면 단백질 GLP1R을 표적화하기 위해 (예를 들어, β-섬(islet)을 표적화하기 위해) 대상 전달 분자를 사용하고자 할 수 있다. 이러한 경우에, 시스테인 치환 및/또는 삽입을 위한 (예를 들어, 핵산 페이로드에의 컨쥬게이션을 위한) 아미노산은, 엑센딘-4 아미노산 서열 (HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 번호 1)임)을, 가교결합된 복합체가 2개의 결합 틈을 파괴하지 않도록 마주보고 있어야 하는 방향을 예상하기 위해, 3D 공간에서 회전될 수 있는 PDB 3차원 렌더링을 사용하여, 글루카곤-GCGR (4ERS) 및 GLP1-GLP1R-ECD 복합체 (PDB: 3IOL)의 결정 구조에 대하여 정렬함으로써 동정될 수 있다 (예를 들어, 하기 실시예 부분, 및 도 3 및 도 4 참조). 표적화 리간드 (패밀리 B GPCR을 표적화함)의 바람직한 가교결합 부위 (예를 들어, 시스테인 잔기의 치환/삽입을 위한 부위)가 상응하는 수용체의 2개의 결합 틈에 대하여 충분히 직교하는 경우, 고친화성 결합뿐 아니라, (예를 들어, 최적의 페이로드 방출을 위하여) 수반되는 긴 엔도좀 재순환 경로 격리가 일어날 수 있다.

[0044] 일부 경우에서, 대상 전달 분자는 엑센딘-4 아미노산 서열 (서열 번호 1)에 대하여 85% 이상 (예를 들어, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%)의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 표적화 리간드를 포함한다. 일부 이러한 경우에, 표적화 리간드는 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 L10, S11 및 K12에 상응하는 하나 이상의 위치에서의 시스테인 치환 또는 삽입을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 S11에 상응하는 위치에서의 시스테인 치환 또는 삽입을 포함한다. 일부 경우에서, 대상 전달 분자는 엑센딘-4 아미노산 서열 (서열 번호 1)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 표적화 리간드를 포함한다.

[0045] 또 다른 예로서, 일부 경우에서, 본 개시에 따른 표적화 리간드는 섬유아세포 성장 인자 (FGF) 수용체 (FGFR)와 같은 수용체 티로신 키나아제 (RTK)에 대한 결합을 제공한다. 따라서, 일부 경우에서, 표적화 리간드는 FGF의 단편이다 (즉, FGF의 아미노산 서열을 포함함). 일부 경우에서, 표적화 리간드는 오르토스테릭의 결합 동안 점유된 RTK의 분절에 결합한다 (예를 들어, 하기 실시예 부분 참조). 일부 경우에서, 표적화 리간드는 RTK의 헤파린-친화성 도메인에 결합한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 FGF 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공하고, 아미노산 서열 KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (서열 번호 4)과 85% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 FGF 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공하고, 서열 번호 4에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0046] 일부 경우에서, RTK의 오르토스테릭 부위를 차지하는 작은 도메인 (예를 들어, 5-40개의 아미노산 길이)은, 천

연 성장 인자 리간드에 대하여 고유할 수 있는, 세포-증식 및 원종양 유전자 신호전달 캐스케이드의 개입 없이, RTK (예를 들어, FGFR)의 핵 분류에 관한 세포내이입 경로에 개입하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 절단된 bFGF (tbFGF) 펩티드 (a.a.30-115)는 bFGF 수용체 결합 부위 및 헤파린-결합 부위의 일부를 함유하며, 이러한 펩티드는 세포 증식을 자극하지 않으면서 세포 표면 상의 FGFR에 효과적으로 결합할 수 있다. tbFGF의 서열은 KRLYCKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQL-QAEERGVVSIKGVCANRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFFFERLESNNYNTY (서열 번호 13)이다 (예를 들어, [Cai et al., Int J Pharm. 2011 Apr 15;408(1-2):173-82] 참조).

[0047] 일부 경우에서, 표적화 리간드는 FGF 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공하고, 아미노산 서열 HFKDPK (서열 번호 5) (예를 들어, 하기 실시예 부분 참조)을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 FGF 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공하고, 아미노산 서열 LESNNYNT (서열 번호 6) (예를 들어, 하기 실시예 부분 참조)을 포함한다.

[0048] 일부 경우에서, 본 개시에 따른 표적화 리간드는 세포 표면 당단백질에 대한 표적화된 결합을 제공한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 세포-세포 부착 분자에 대한 표적화된 결합을 제공한다. 예를 들어, 일부 경우에서, 표적화 리간드는, 세포-세포 부착 인자로 기능하는 세포 표면 당단백질이며, (예를 들어, 골수의) 조혈 줄기 세포 상에서 발견된 단백질인, CD34에 대한 표적화된 결합을 제공한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 E-셀렉틴, L-셀렉틴 또는 P-셀렉틴과 같은 셀렉틴의 단편 (예를 들어, 셀렉틴의 처음 40개의 아미노산에서 발견된 신호 펩티드)이다. 일부 경우에서, 대상 표적화 리간드는 셀렉틴 (예를 들어, E-셀렉틴, L-셀렉틴, P-셀렉틴)의 스시(sushi) 도메인을 포함한다.

[0049] 일부 경우에서, 표적화 리간드는 아미노산 서열 MIASQFLSALTLVLLIKESGA (서열 번호 7)과 85% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 서열 번호 7로서 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 아미노산 서열 MVFPWRCEGTYWGSRNILKLWVWTLLCCDFLIHHGTHC (서열 번호 8)과 85% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 서열 번호 8로서 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 아미노산 서열 MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCCDFLAHHGTDC (서열 번호 9)와 85% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 서열 번호 9로서 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 아미노산 서열 MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCC (서열 번호 10)과 85% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 서열 번호 10으로서 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0050] 대상 표적화 리간드로서 사용될 수 있는 셀렉틴의 단편 (예를 들어, 셀렉틴의 처음 40개의 아미노산에서 발견된 신호 펩티드)은, 일부 경우에서 특이적으로-변형된 시알로뮤신(sialomucin)에 대한 강한 결합을 달성할 수 있으며, 예를 들어 세포외 CD34의 다양한 시알릴 루이스(Sialyl Lewis)^{x} 변형 / O-시알릴화(sialylation)는 골수, 림프, 비장 및 편도 구획에 대한 P-셀렉틴, L-셀렉틴 및 E-셀렉틴의 차별적인 친화성을 유도할 수 있다. 반대로, 일부 경우에서, 표적화 리간드는 CD34의 세포외 부분일 수 있다. 일부 이러한 경우에, 리간드의 시알릴화의 변형을 이용하여, 표적화 리간드를 다양한 셀렉틴에 대하여 차별적으로 표적화할 수 있다.

[0051] 일부 경우에서, 본 개시에 따른 표적화 리간드는 트랜스페린 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공한다. 일부 이러한 경우에, 표적화 리간드는 아미노산 서열 THRPPMWSPVWP (서열 번호 11)과 85% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 서열 번호 11로서 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0052] 일부 경우에서, 본 개시에 따른 표적화 리간드는 인테그린 (예를 들어, α5β1 인테그린)에 대한 표적화된 결합을 제공한다. 일부 이러한 경우에, 표적화 리간드는 아미노산 서열 RRETAWA (서열 번호 12)와 85% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 서열 번호 12로서 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 아미노산 서열 RGD를 포함한다.

[0053] 표적화 리간드를 함께 구성하는 2개의 상이한 펩티드 서열을 갖는 전달 분자가 또한 제공된다. 예를 들어, 일부 경우에서, 표적화 리간드는 2가 (예를 들어, 이형2가(heterobivalent))이다. 일부 경우에서, 세포-투과성 펩티드 및/또는 헤파린 술페이트 프로테오글리칸 결합 리간드는, 본 개시의 표적화 리간드 중 임의의 것과 함께

이형2가 세포내이입 트리거(trigger)로서 사용된다. 이형2가 표적화 리간드는 표적화 리간드 중 하나로부터의 친화성 서열 및 상이한 표적화 리간드로부터의 오르토스테릭 결합 서열 (예를 들어, 목적하는 새포내이입 수송 경로에 개입하는 것으로 공지된 것)을 포함할 수 있다.

[0054] *컨쥬게이션 파트너 / 페이로드*

[0055] *핵산 페이로드*

[0056] 일부 구현예에서, 본 개시의 전달 분자의 표적화 리간드는 핵산 페이로드에 컨쥬게이션된다 (예를 들어, 도 1, 패널 A-B 참조). 일부 구현예에서, 본 개시의 전달 분자는 핵산 페이로드와 응축된다 (이와 정전기적으로 상호작용한다). 핵산 페이로드는 임의의 관심 핵산일 수 있으며, 예를 들어 핵산 페이로드는 선형 또는 원형일 수 있고, 플라스미드, 바이러스 게놈, RNA, DNA 등일 수 있다. 일부 경우에서, 핵산 페이로드는 RNAi 작용제 또는 RNAi 작용제를 인코딩하는 DNA 템플릿이며, 여기서 RNAi 작용제는, 예를 들어 shRNA 또는 siRNA일 수 있다. 일부 경우에서, 핵산 페이로드는 siRNA 분자이다. 일부 구현예에서, 본 개시의 전달 분자의 표적화 리간드는 단백질 페이로드에 컨쥬게이션되고, 일부 경우에서, 표적화 리간드는 (예를 들어, 복합체의 단백질 구성요소 또는 RNA 구성요소에의 컨쥬게이션을 통해) 리보핵단백질 복합체에 컨쥬게이션된다. 컨쥬게이션은 임의의 편리한 기술에 의해 달성될 수 있으며, 다수의 상이한 컨쥬게이션 화학이 당업자에게 공지될 것이다. 일부 경우에서, 컨쥬게이션은 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합)을 통해 일어난다. 일부 경우에서, 컨쥬게이션은 아민-반응성 화학을 사용하여 달성된다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 시스테인 잔기를 포함하고, 시스테인 잔기를 통해 핵산 페이로드에 컨쥬게이션된다.

[0057] 용어 "핵산 페이로드"는, 변형된 핵산을 포함한다. 마찬가지로, 용어 "RNAi 작용제" 및 "siRNA"는, 변형된 핵산을 포함한다. 예를 들어, 핵산 분자는 모방물일 수 있으며, 이는 변형된 당 백본, 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드간 연결 (예를 들어, 하나 이상의 포스포로티오에이트 및/또는 헤테로원자 뉴클레오시드간 연결), 하나 이상의 변형된 염기 등을 포함할 수 있다. 대상 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)는 모르폴리노 백본 구조를 가질 수 있다. 일부 경우에서, 대상 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)는 하나 이상의 잠금 핵산 (LNA)을 가질 수 있다. 적합한 당 치환기에는, 메톡시 ($-O-CH_3$), 아미노프로폭시 ($--O\ CH_2\ CH_2\ CH_2NH_2$), 알릴 ($-CH_2-CH=CH_2$), -O-알릴 ($--O--\ CH_2-CH=CH_2$) 및 플루오로 (F)가 포함된다. 2'-당 치환기는 아라비노 (위) 위치 또는 리보 (아래) 위치에 있을 수 있다. 적합한 염기 변형에는, 하기와 같은 합성 및 천연 핵염기가 포함된다: 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-히드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 ($-C=C-CH_3$) 우라실 및 시토신, 및 피리미딘 염기의 다른 알키닐 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (유사우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌. 추가의 변형된 핵염기에는, 트리시클릭 피리미딘, 예컨대 페녹사진 시티딘(1H-피리미도(5,4-b)(1,4)벤족사진-2(3H)-온), 페노티아진 시티딘 (1H-피리미도(5,4-b)(1,4)벤조티아진-2(3H)-온), G-클램프(clamp), 예컨대 치환된 페녹사진 시티딘 (예를 들어 9-(2-아미노에톡시)-H-피리미도(5,4-(b) (1,4)벤족사진-2(3H)-온), 카르바졸 시티딘 (2H-피리미도(4,5-b)인돌-2-온), 피리도인돌 시티딘 (H-피리도(3',2':4,5) 피롤로(2,3-d)피리미딘-2-온)이 포함된다.

[0058] 일부 경우에서, 핵산 페이로드는 컨쥬게이트 모이어티 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드의 활성, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증진시키는 것)를 포함할 수 있다. 이러한 모이어티 또는 컨쥬게이트는 1차 또는 2차 히드록실기와 같은 관능기에 공유 결합된 컨쥬게이트기를 포함할 수 있다. 컨쥬게이트기에는, 비제한적으로, 인터칼레이터(intercalator), 리포터 분자, 폴리아민, 폴리아미드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에테르, 올리고머의 약력학적 특성을 증진시키는 기, 및 올리고머의 약동학적 특성을 증진시키는 기가 포함된다. 적합한 컨쥬게이트기에는, 비제한적으로, 콜레스테롤, 지질, 인지질, 비오틴, 페나진, 폴레이트, 페난트리딘, 안트라퀴논, 아크리딘, 플루오레세인, 로다민, 쿠마린 및 염료가 포함된다. 약력학적 특성을 증진시키는 기에는, 흡수를 개선시키고, 분해에 대한 내성을 증진시키고/시키거나, 표적 핵산과의 서열-특이적 하이브리드화를 강화시키는 기가 포함된다. 약동학적 특성을 증진시키는 기에는, 대상 핵산의 흡수, 분포, 대사 또는 배설을 개선시키는 기가 포함된다.

[0059] *하전된 중합체 폴리펩티드 도메인*

[0060] 일부 경우에서, 대상 전달 분자의 표적화 리간드는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 (양이온성 앵커링 도메

인)에 컨쥬게이션된다 (예를 들어, 도 1, 패널 C-F 참조). 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 반복되는 양이온성 잔기 (예를 들어, 아르기닌, 리신, 히스티딘)를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 양이온성 앵커링 도메인은 3 내지 30개의 아미노산 (예를 들어, 3-28, 3-25, 3-24, 3-20, 4-30, 4-28, 4-25, 4-24 또는 4-20개의 아미노산; 또는 예를 들어, 4-15, 4-12, 5-30, 5-28, 5-25, 5-20, 5-15, 5-12개의 아미노산) 범위의 길이를 갖는다. 일부 경우에서, 양이온성 앵커링 도메인은 4 내지 24개의 아미노산 범위의 길이를 갖는다. 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 적합한 예에는, 비제한적으로, RRRRRRRRR (9R)(서열 번호 15) 및 HHHHHH (6H)(서열 번호 16)이 포함된다.

[0061] 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 (양이온성 앵커링 도메인)은 임의의 편리한 양이온성 하전된 도메인일 수 있다. 예를 들어, 이러한 도메인은 히스톤 테일(tail) 펩티드 (HTP)일 수 있다. 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 히스톤 및/또는 히스톤 테일 펩티드를 포함한다 (예를 들어, 양이온성 폴리펩티드는 히스톤 및/또는 히스톤 테일 펩티드일 수 있음). 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 NLS-함유 펩티드를 포함한다 (예를 들어, 양이온성 폴리펩티드는 NLS-함유 펩티드일 수 있음). 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 미토콘드리아 위치 신호를 포함하는 펩티드를 포함한다 (예를 들어, 양이온성 폴리펩티드는 미토콘드리아 위치 신호를 포함하는 펩티드일 수 있음).

[0062] 일부 경우에서, 대상 전달 분자의 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 전달 분자가 페이로드 (예를 들어, 핵산 페이로드 및/또는 단백질 페이로드)와 상호작용하는 (예를 들어 응축을 위해, 예를 들어 정전기적으로 상호작용하는) 방식으로 사용된다.

[0063] 일부 경우에서, 대상 전달 분자의 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은, 예를 들어 표적화 리간드가 목적하는 세포/세포 표면 단백질에 나노입자를 표적화하는데 사용되도록, 전달 분자로 나노입자의 표면을 코팅하기 위한 앵커로서 사용된다 (예를 들어, 도 1, 패널 C-D 참조). 따라서, 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 나노입자의 하전된 안정화 층과 정전기적으로 상호작용한다. 예를 들어, 일부 경우에서, 나노입자는 안정화 층 (예를 들어, 실리카, 펩토이드, 폴리시스테인 또는 인산칼슘 코팅)에 의해 둘러싸인 코어 (예를 들어, 핵산, 단백질 및/또는 리보핵단백질 복합체 페이로드 포함)를 포함한다. 일부 경우에서, 안정화 층은 음전하를 갖기 때문에, 양으로 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 안정화 층과 상호작용하여, 전달 분자를 나노입자에 효과적으로 앵커링하고, 대상 표적화 리간드로 나노입자 표면을 코팅할 수 있다 (예를 들어, 도 1, 패널 C 및 D 참조). 컨쥬게이션은 임의의 편리한 기술에 의해 달성될 수 있으며, 다수의 상이한 컨쥬게이션 화학이 당업자에게 공지될 것이다. 일부 경우에서, 컨쥬게이션은 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합)을 통해 일어난다. 일부 경우에서, 컨쥬게이션은 아민-반응성 화학을 사용하여 달성된다. 일부 경우에서, 표적화 리간드 및 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 동일한 폴리펩티드의 일부이기 때문에 컨쥬게이션된다.

[0064] 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 (양이온성)은, 하기로부터 선택되는 중합체를 포함할 수 있다: 폴리(아르기닌)(PR), 폴리(리신)(PK), 폴리(히스티딘)(PH), 폴리(오르니틴), 폴리(시트룰린) 및 이들의 조합. 일부 경우에서, 주어진 양이온성 아미노산 중합체는 아르기닌, 리신, 히스티딘, 오르니틴 및 시트룰린 잔기의 (임의의 편리한 조합으로의) 혼합물을 포함할 수 있다. 중합체는 L-이성질체 또는 D-이성질체의 중합체로서 존재할 수 있으며, 여기서 D-이성질체가 분해되는데 더 긴 시간이 걸리기 때문에 표적 세포에서 보다 안정하다. 따라서, D-이성질체 폴리(아미노산)의 내포는 분해 (및 후속 페이로드 방출)를 지연시킨다. 따라서, 페이로드 방출 속도가 제어될 수 있고, 이는 D-이성질체의 중합체 대 L-이성질체의 중합체의 비에 비례하며, L-이성질체에 대한 D-이성질체의 비율이 높으면 페이로드 방출의 지속 기간이 증가한다 (즉, 방출 속도는 감소함). 즉, D- 및 L- 이성질체의 상대적인 양은 분해 및 페이로드 방출에 대한 방출 동력학 및 효소 감수성을 조절할 수 있다.

[0065] 일부 경우에서, 양이온성 중합체는 양이온성 아미노산 중합체 (예를 들어, 폴리(아르기닌)(PR), 폴리(리신)(PK), 폴리(히스티딘)(PH), 폴리(오르니틴), 폴리(시트룰린))의 D-이성질체 및 L-이성질체를 포함한다. 일부 경우에서, D- 대 L- 이성질체 비는, 10:1-1:10 (예를 들어, 8:1-1:10, 6:1-1:10, 4:1-1:10, 3:1-1:10, 2:1-1:10, 1:1-1:10, 10:1-1:8, 8:1-1:8, 6:1-1:8, 4:1-1:8, 3:1-1:8, 2:1-1:8, 1:1-1:8, 10:1-1:6, 8:1-1:6, 6:1-1:6, 4:1-1:6, 3:1-1:6, 2:1-1:6, 1:1-1:6, 10:1-1:4, 8:1-1:4, 6:1-1:4, 4:1-1:4, 3:1-1:4, 2:1-1:4, 1:1-1:4, 10:1-1:3, 8:1-1:3, 6:1-1:3, 4:1-1:3, 3:1-1:3, 2:1-1:3, 1:1-1:3, 10:1-1:2, 8:1-1:2, 6:1-1:2, 4:1-1:2, 3:1-1:2, 2:1-1:2, 1:1-1:2, 10:1-1:1, 8:1-1:1, 6:1-1:1, 4:1-1:1, 3:1-1:1 또는 2:1-1:1)의 범위 내에 있다.

[0066] 따라서, 일부 경우에서, 양이온성 중합체는 D-이성질체의 중합체 (예를 들어, 폴리(D-아르기닌), 폴리(D-리신),

폴리(D-히스티딘), 폴리(D-오르니틴) 및 폴리(D-시트룰린)에서 선택됨)인 제1 양이온성 중합체 (예를 들어, 아미노산 중합체)를 포함하고; L-이성질체의 중합체 (예를 들어, 폴리(L-아르기닌), 폴리(L-리신), 폴리(L-히스티딘), 폴리(L-오르니틴) 및 폴리(L-시트룰린)에서 선택됨)인 제2 양이온성 중합체 (예를 들어, 아미노산 중합체)를 포함한다. 일부 경우에서, 제1 양이온성 중합체 (D-이성질체) 대 제2 양이온성 중합체 (L-이성질체)의 비는, 10:1-1:10 (예를 들어, 8:1-1:10, 6:1-1:10, 4:1-1:10, 3:1-1:10, 2:1-1:10, 1:1-1:10, 10:1-1:8, 8:1-1:8, 6:1-1:8, 4:1-1:8, 3:1-1:8, 2:1-1:8, 1:1-1:8, 10:1-1:6, 8:1-1:6, 6:1-1:6, 4:1-1:6, 3:1-1:6, 2:1-1:6, 1:1-1:6, 10:1-1:4, 8:1-1:4, 6:1-1:4, 4:1-1:4, 3:1-1:4, 2:1-1:4, 1:1-1:4, 10:1-1:3, 8:1-1:3, 6:1-1:3, 4:1-1:3, 3:1-1:3, 2:1-1:3, 1:1-1:3, 10:1-1:2, 8:1-1:2, 6:1-1:2, 4:1-1:2, 3:1-1:2, 2:1-1:2, 1:1-1:2, 10:1-1:1, 8:1-1:1, 6:1-1:1, 4:1-1:1, 3:1-1:1 또는 2:1-1:1)의 범위 내에 있다.

[0067] 일부 구현예에서, 양이온성 중합체는 (예를 들어, 양이온성 중합체의 상기 예 중 임의의 것에 더하여 또는 이를 대신하여) 폴리(에틸렌이민), 폴리(아미도아민) (PAMAM), 폴리(아스파르타미드), 폴리펩토이드 (예를 들어, 코어 응축을 위한 "거미줄망"형 분지를 형성하기 위한), 전하-관능화(charge-functionalized) 폴리에스테르, 양이온성 다당류, 아세틸화 아미노 당, 키토산 또는 이들의 임의의 조합 (예를 들어, 선형 또는 분지형 형태)을 포함하는 양이온성 중합체를 포함한다.

[0068] 일부 구현예에서, 양이온성 중합체는 1-200 kDa (예를 들어, 1-150, 1-100, 1-50, 5-200, 5-150, 5-100, 5-50, 10-200, 10-150, 10-100, 10-50, 15-200, 15-150, 15-100 또는 15-50 kDa) 범위의 분자량을 가질 수 있다. 예로서, 일부 경우에서, 양이온성 중합체는, 예를 들어 약 29 kDa의 분자량을 갖는 폴리(L-아르기닌)을 포함한다. 또 다른 예로서, 일부 경우에서, 양이온성 중합체는 약 25 kDa의 분자량을 갖는 선형 폴리(에틸렌이민) (PEI)을 포함한다. 또 다른 예로서, 일부 경우에서, 양이온성 중합체는 약 10 kDa의 분자량을 갖는 분지형 폴리(에틸렌이민)을 포함한다. 또 다른 예로서, 일부 경우에서, 양이온성 중합체는 약 70 kDa의 분자량을 갖는 분지형 폴리(에틸렌이민)을 포함한다. 일부 경우에서, 양이온성 중합체는 PAMAM을 포함한다.

[0069] 일부 경우에서, 양이온성 아미노산 중합체는, 예를 들어 링커, NLS 및/또는 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, 히스톤 또는 HTP)에의 컨쥬게이션을 가능하게 할 수 있는 시스테인 잔기를 포함한다. 예를 들어, 시스테인 잔기는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 및/또는 아민-반응성 화학을 통해 가교결합 (컨쥬게이션)에 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 양이온성 중합체 조성물의 양이온성 아미노산 중합체 (예를 들어, 폴리(아르기닌)(PR), 폴리(리신)(PK), 폴리(히스티딘)(PH), 폴리(오르니틴) 및 폴리(시트룰린), 폴리(D-아르기닌)(PDR), 폴리(D-리신)(PDK), 폴리(D-히스티딘)(PDH), 폴리(D-오르니틴) 및 폴리(D-시트룰린), 폴리(L-아르기닌)(PLR), 폴리(L-리신)(PLK), 폴리(L-히스티딘)(PLH), 폴리(L-오르니틴) 및 폴리(L-시트룰린))는, 시스테인 잔기를 포함한다. 일부 경우에서, 양이온성 아미노산 중합체는 N- 및/또는 C- 말단 상에 시스테인 잔기를 포함한다. 일부 경우에서, 양이온성 아미노산 중합체는 내부 시스테인 잔기를 포함한다.

[0070] 일부 경우에서, 양이온성 아미노산 중합체는 핵 위치 신호 (NLS) (하기에 보다 상세하게 기재됨)를 포함한다 (및/또는 이에 컨쥬게이션된다). 따라서, 일부 구현예에서, 양이온성 아미노산 중합체 (예를 들어, 폴리(아르기닌)(PR), 폴리(리신)(PK), 폴리(히스티딘)(PH), 폴리(오르니틴) 및 폴리(시트룰린), 폴리(D-아르기닌)(PDR), 폴리(D-리신)(PDK), 폴리(D-히스티딘)(PDH), 폴리(D-오르니틴) 및 폴리(D-시트룰린), 폴리(L-아르기닌)(PLR), 폴리(L-리신)(PLK), 폴리(L-히스티딘)(PLH), 폴리(L-오르니틴) 및 폴리(L-시트룰린))는, 하나 이상 (예를 들어, 2개 이상, 3개 이상 또는 4개 이상)의 NLS를 포함한다. 일부 경우에서, 양이온성 아미노산 중합체는 N- 및/또는 C- 말단 상에 NLS를 포함한다. 일부 경우에서, 양이온성 아미노산 중합체는 내부 NLS를 포함한다.

[0071] *히스톤 테일 펩티드 (HTP)*

[0072] 일부 구현예에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 히스톤 펩티드 또는 히스톤 펩티드의 단편, 예컨대 N-말단 히스톤 테일 (예를 들어, H1, H2 (예를 들어, H2A, H2AX, H2B), H3 또는 H4 히스톤 단백질의 히스톤 테일)을 포함한다. 히스톤 단백질의 테일 단편은 본원에서 히스톤 테일 펩티드 (HTP)로 지칭된다. 이러한 단백질 (히스톤 및/또는 HTP)이 대상 전달 분자의 일부로서 핵산 페이로드와 응축될 수 있기 때문에, 하나 이상의 히스톤 또는 HTP를 포함하는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 때때로 본원에서 뉴클레오좀-모방 도메인으로 지칭된다. 히스톤 및/또는 HTP는 또한 단량체로서 포함될 수 있으며, 일부 경우에서, 핵산 페이로드를 응축할 때, 이량체, 삼량체, 사량체 및/또는 팔량체를 형성한다. 일부 경우에서, HTP는 히스톤 아세틸트랜스퍼라아제-매개 아세틸화의 경우에서와 같이, 다양한 히스톤 변형에 의해 탈양성자화될 수 있을 뿐 아니라, 코어 구성요소의 효과적인 핵-특이적 비포장화(unpackaging) (예를 들어, 페이로드의 방출)를 매개할 수 있다.

[0073] 일부 구현예에서, 대상 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은, H2A, H2AX, H2B, H3 또는 H4 단백질의 아미노산 서

열을 갖는 단백질을 포함한다. 일부 경우에서, 대상 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 히스톤 단백질의 N-말단 영역에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함한다. 예를 들어, 단편 (HTP)은 히스톤 단백질의 처음 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 N-말단 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 대상 HTP는, 히스톤 단백질의 N-말단 영역으로부터 5-50개의 아미노산 (예를 들어, 5-45, 5-40, 5-35, 5-30, 5-25, 5-20, 8-50, 8-45, 8-40, 8-35, 8-30, 10-50, 10-45, 10-40, 10-35 또는 10-30개의 아미노산)을 포함한다. 일부 경우에서, 대상 양이온성 폴리펩티드는 5-150개의 아미노산 (예를 들어, 5-100, 5-50, 5-35, 5-30, 5-25, 5-20, 8-150, 8-100, 8-50, 8-40, 8-35, 8-30, 10-150, 10-100, 10-50, 10-40, 10-35 또는 10-30개의 아미노산)을 포함한다.

[0074] 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, 히스톤 또는 HTP, 예를 들어 H1, H2, H2A, H2AX, H2B, H3 또는 H4)는, (예를 들어, 일부 경우에서, 하나 이상의 히스티딘, 리신, 아르기닌 또는 다른 상보성 잔기 상에서) 번역 후 변형을 포함한다. 예를 들어, 일부 경우에서, 양이온성 폴리펩티드는 메틸화된 (및/또는 메틸화 / 탈메틸화되기 쉬운), 아세틸화된 (및/또는 아세틸화 / 탈아세틸화되기 쉬운), 크로토닐화된 (및/또는 크로토닐화 / 탈크로토닐화되기 쉬운), 유비퀴틴화된 (및/또는 유비퀴틴화 / 탈유비퀴틴화되기 쉬운), 인산화된 (및/또는 인산화 / 탈인산화되기 쉬운), SUMO화된 (및/또는 SUMO화 / 탈SUMO화되기 쉬운), 파르네실화된 (및/또는 파르네실화 / 탈파르네실화되기 쉬운), 황산화된 (및/또는 황산화 / 탈황산화되기 쉬운) 것이거나, 또는 달리 번역 후 변형된다. 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, 히스톤 또는 HTP, 예를 들어 H1, H2, H2A, H2AX, H2B, H3 또는 H4)는, p300/CBP 기질이다 (예를 들어, 하기의 HTP 예 참조). 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, 히스톤 또는 HTP, 예를 들어 H1, H2, H2A, H2AX, H2B, H3 또는 H4)는, (예를 들어, 티오술페이트 술퍼트랜스퍼라아제 기질로서) 황산화된 또는 황산화되기 쉬운 하나 이상의 티올 잔기를 포함한다 (예를 들어, 시스테인 및/또는 메티오닌 잔기를 포함할 수 있음). 일부 경우에서, 양이온성 폴리펩티드의 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, 히스톤 또는 HTP, 예를 들어 H1, H2, H2A, H2AX, H2B, H3 또는 H4)는 C-말단 상에서 아미드화된다. 히스톤 H2A, H2B, H3 및 H4 (및/또는 HTP)는, 전사 활성을 촉진 또는 억제하고, 핵-특이적 방출 동력학을 변경하기 위해, 이의 임의의 리신에서 단일메틸화, 이중메틸화 또는 삼중메틸화될 수 있다.

[0075] 양이온성 폴리펩티드는 목적하는 변형을 갖는 것으로 합성될 수 있거나, 또는 시험관내 반응으로 변형될 수 있다. 대안적으로, 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, 히스톤 또는 HTP)가 세포 집단에서 발현될 수 있고, 목적하는 변형된 단백질이 단리/정제될 수 있다. 일부 경우에서, 대상 나노입자의 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 메틸화 HTP를 포함하며, 예를 들어 H3K4(Me3)의 HTP 서열을 포함한다 - (서열 번호 75 또는 88)로서 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, 히스톤 또는 HTP, 예를 들어 H1, H2, H2A, H2AX, H2B, H3 또는 H4)는 C-말단 아미드를 포함한다.

[0076] *히스톤 및 HTP의 예*

[0077] 예에는, 비제한적으로, 하기 서열이 포함된다:

[0078] H2A

[0079] SGRGKQGGKARAKAKTRSSR (서열 번호 62) [1-20]

[0080] SGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGGG (서열 번호 63) [1-39]

[0081] MSGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYAERVGAGAPVYLAAVLEYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLLGKVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTESHHKAKGK(서열 번호 64) [1-130]

[0082] H2AX

[0083] CKATQASQEY (서열 번호 65) [134 - 143]

[0084] KKTSATVGPKAPSGGKKATQASQEY(서열 번호 66) [KK 120-129]

[0085] MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGHYAERVGAGAPVYLAAVLEYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTSATVGPKAPSGGKKATQASQEY(서열 번호 67) [1-143]

[0086] H2B

[0087] PEPA - K(cr) - SAPAPK (서열 번호 68) [1-11 H2BK5(cr)]

[0088] [cr: 크로토닐화된 (크로토닐화)]

[0089] PEPAKSAPAPK (서열 번호 69) [1-11]

[0090] AQKKDGKKRKRSRKE (서열 번호 70) [21-35]

[0091] MPEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKESYSIYVYKVLKQVHPDTGISSKAMGIMNSFVNDIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLL LPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK (서열 번호 71) [1-126]

[0092] H3

[0093] ARTKQTAR (서열 번호 72) [1-8]

[0094] ART - K(Me1) - QTARKS (서열 번호 73) [1-8 H3K4(Me1)]

[0095] ART - K(Me2) - QTARKS (서열 번호 74) [1-8 H3K4(Me2)]

[0096] ART - K(Me3) - QTARKS (서열 번호 75) [1-8 H3K4(Me3)]

[0097] ARTKQTARK - pS - TGGKA (서열 번호 76) [1-15 H3pS10]

[0098] ARTKQTARKSTGGKAPRKWC - NH2 (서열 번호 77) [1-18 WC, 아미드]

[0099] ARTKQTARKSTGG - K(Ac) - APRKQ (서열 번호 78) [1-19 H3K14(Ac)]

[0100] ARTKQTARKSTGGKAPRKQL (서열 번호 79) [1-20]

[0101] ARTKQTAR - K(Ac) - STGGKAPRKQL (서열 번호 80) [1-20 H3K9(Ac)]

[0102] ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA (서열 번호 81) [1-21]

[0103] ARTKQTAR - K(Ac) - STGGKAPRKQLA (서열 번호 82) [1-21 H3K9(Ac)]

[0104] ARTKQTAR - K(Me2) - STGGKAPRKQLA (서열 번호 83) [1-21 H3K9(Me1)]

[0105] ARTKQTAR - K(Me2) - STGGKAPRKQLA (서열 번호 84) [1-21 H3K9(Me2)]

[0106] ARTKQTAR - K(Me2) - STGGKAPRKQLA (서열 번호 85) [1-21 H3K9(Me3)]

[0107] ART - K(Me1) - QTARKSTGGKAPRKQLA (서열 번호 86) [1-21 H3K4(Me1)]

[0108] ART - K(Me2) - QTARKSTGGKAPRKQLA (서열 번호 87) [1-21 H3K4(Me2)]

[0109] ART - K(Me3) - QTARKSTGGKAPRKQLA (서열 번호 88) [1-21 H3K4(Me3)]

[0110] ARTKQTAR - K(Ac) - pS - TGGKAPRKQLA (서열 번호 89) [1-21 H3K9(Ac), pS10]

[0111] ART - K(Me3) - QTAR - K(Ac) - pS - TGGKAPRKQLA (서열 번호 90) [1-21 H3K4(Me3), K9(Ac), pS10]

[0112] ARTKQTARKSTGGKAPRKQLAC (서열 번호 91) [1-21 Cys]

[0113] ARTKQTAR - K(Ac) - STGGKAPRKQLATKA (서열 번호 92) [1-24 H3K9(Ac)]

[0114] ARTKQTAR - K(Me3) - STGGKAPRKQLATKA (서열 번호 93) [1-24 H3K9(Me3)]

[0115] ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAA (서열 번호 94) [1-25]

[0116] ART - K(Me3) - QTARKSTGGKAPRKQLATKAA (서열 번호 95) [1-25 H3K4(Me3)]

[0117] TKQTAR - K(Me1) - STGGKAPR (서열 번호 96) [3-17 H3K9(Me1)]

[0118] TKQTAR - K(Me2) - STGGKAPR (서열 번호 97) [3-17 H3K9(Me2)]

[0119] TKQTAR - K(Me3) - STGGKAPR (서열 번호 98) [3-17 H3K9(Me3)]

[0120] KSTGG - K(Ac) - APRKQ (서열 번호 99) [9-19 H3K14(Ac)]

[0121] QTARKSTGGKAPRKQLASK (서열 번호 100) [5-23]

[0122] APRKQLATKAARKSAPATGGVKKPH (서열 번호 101) [15-39]

[0123] ATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPG (서열 번호 102) [21-44]

[0124] KAARKSAPA (서열 번호 103) [23-31]

[0125] KAARKSAPATGG (서열 번호 104) [23-34]

[0126] KAARKSAPATGGC (서열 번호 105) [23-34 Cys]

[0127] KAAR - K(Ac) - SAPATGG (서열 번호 106) [H3K27(Ac)]

[0128] KAAR - K(Me1) - SAPATGG (서열 번호 107) [H3K27(Me1)]

[0129] KAAR - K(Me2) - SAPATGG (서열 번호 108) [H3K27(Me2)]

[0130] KAAR - K(Me3) - SAPATGG (서열 번호 109) [H3K27(Me3)]

[0131] AT - K(Ac) - AARKSAPATGGVKKPHRYRPG (서열 번호 110) [21-44 H3K23(Ac)]

[0132] ATKAARK - pS - APATGGVKKPHRYRPG (서열 번호 111) [21-44 pS28]

[0133] ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGV (서열 번호 112) [1-35]

[0134] STGGV - K(Me1) - KPHRY (서열 번호 113) [31-41 H3K36(Me1)]

[0135] STGGV - K(Me2) - KPHRY (서열 번호 114) [31-41 H3K36(Me2)]

[0136] STGGV - K(Me3) - KPHRY (서열 번호 115) [31-41 H3K36(Me3)]

[0137] GTVALREIRRYQ - K(Ac) - STELLIR (서열 번호 116) [44-63 H3K56(Ac)]

[0138] ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALRE (서열 번호 117) [1-50]

[0139] TELLIRKLPFQRLVREIAQDF - K(Me1) - TDLRFQSAAI (서열 번호 118) [H3K79(Me1)]

[0140] EIAQDFKTDLR (서열 번호 119) [73-83]

[0141] EIAQDF - K(Ac) - TDLR (서열 번호 120) [73-83 H3K79(Ac)]

[0142] EIAQDF - K(Me3) - TDLR (서열 번호 121) [73-83 H3K79(Me3)]

[0143] RLVREIAQDFKTDLRFQSSAV (서열 번호 122) [69-89]

[0144] RLVREIAQDFK - (Me1) - TDLRFQSSAV (서열 번호 123) [69-89 H3K79 (Me1), 아미드]

[0145] RLVREIAQDFK - (Me2) - TDLRFQSSAV (서열 번호 124) [69-89 H3K79 (Me2), 아미드]

[0146] RLVREIAQDFK - (Me3) - TDLRFQSSAV (서열 번호 125) [69-89 H3K79 (Me3), 아미드]

[0147] KRVTIMPKDIQLARRIRGERA (서열 번호 126) [116-136]

[0148] MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLPFQRLMREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEACESYLV GLFEDTNLCVIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA(서열 번호 127) [1-136]

[0149] H4

[0150] SGRGKGG (서열 번호 128) [1-7]

[0151] RGKGGKGLGKGA (서열 번호 129) [4-12]

[0152] SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKV (서열 번호 130) [1-21]

[0153] KGLGKGGAKRHRKVLRDNWC - NH2 (서열 번호 131) [8-25 WC, 아미드]

[0154] SGRG - K(Ac) - GG - K(Ac) - GLG - K(Ac) - GGA - K(Ac) - RHRKVLRDNGSGSK (서열 번호 132) [1-25 H4K5,8,12,16(Ac)]

[0155] SGRGKGGKGLGKGGAKRHRK - NH2 (서열 번호 133) [1-20 H4 PRMT7 (단백질 아르기닌 메틸트랜스퍼라아제 7) 기질, M1]

[0156] SGRG - K(Ac) - GGKGLGKGGAKRHRK (서열 번호 134) [1-20 H4K5 (Ac)]

[0157] SGRGKGG - K(Ac) - GLGKGGAKRHRK (서열 번호 135) [1-20 H4K8 (Ac)]

[0158] SGRGKGGKGLG - K(Ac) - GGAKRHRK (서열 번호 136) [1-20 H4K12 (Ac)]

[0159] SGRGKGGKGLGKGGA - K(Ac) - RHRK (서열 번호 137) [1-20 H4K16 (Ac)]

[0160] KGLGKGGAKRHRKVLRDNWC - NH2 (서열 번호 138) [1-25 WC, 아미드]

[0161] MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGVLKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFG G (서열 번호 139) [1-103]

[0162] 이와 같이, 대상 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드는, 서열 번호 62-139 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 대상 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드는, 서열 번호 62-139 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 대상 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드는, 서열 번호 62-139 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 양이온성 폴리펩티드는 임의의 편리한 변형을 포함할 수 있으며, 다수의 이러한 고려된 변형은 상기 논의되어 있다 (예를 들어 메틸화, 아세틸화, 크로토닐화, 유비퀴틴화, 인산화, SUMO화, 파르네실화, 황산화 등).

[0163] 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드는, 서열 번호 94에 기재된 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드는, 서열 번호 94에 기재된 아미노산 서열과 95% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드는, 서열 번호 94에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드는, 인간 히스톤 3 단백질의 처음 25개의 아미노산을 포함하며, 리신 4 상에 삼중메틸화된 (예를 들어, 일부 경우에서, C-말단 상에 아미드화된) H3K4(Me3) (서열 번호 95)로 나타내어지는 서열을 포함한다.

[0164] 일부 구현예에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, 히스톤 또는 HTP, 예를 들어 H1, H2, H2A, H2AX, H2B, H3 또는 H4)는, 양이온성 (또는 일부 경우에서 음이온성) 아미노산 중합체, 링커, NLS 및/또는 다른 양이온성 폴리펩티드에의 컨쥬게이션을 가능하게 할 수 있는 (예를 들어, 일부 경우에서, 분지형 히스톤 구조를 형성하기 위한) 시스테인 잔기를 포함한다. 예를 들어, 시스테인 잔기는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 및/또는 아민-반응성 화학을 통해 가교결합 (컨쥬게이션)에 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 시스테인 잔기는 내부에 있다. 일부 경우에서, 시스테인 잔기는 N-말단 및/또는 C-말단에 위치되어 있다. 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, 히스톤 또는 HTP, 예를 들어 H1, H2, H2A, H2AX, H2B, H3 또는 H4)는, 시스테인 잔기를 부가하는 돌연변이 (예를 들어, 삽입 또는 치환)를 포함한다. 시스테인을 포함하는 HTP의 예에는, 비제한적으로, 하기가 포함된다:

[0165] CKATQASQEY (서열 번호 140) - H2AX 유래

[0166] ARTKQTARKSTGGKAPRKQLAC (서열 번호 141) - H3 유래

[0167] ARTKQTARKSTGGKAPRKWC (서열 번호 142)

[0168] KAARKSAPATGGC (서열 번호 143) - H3 유래

[0169] KGLGKGGAKRHRKVLRDNWC (서열 번호 144) - H4 유래

[0170] MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLPFQRLMREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEACESYLV GLFEDTNLCVIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA (서열 번호 145) - H3 유래

[0171] 일부 구현예에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인의 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, 히스톤 또는 HTP, 예를 들어 H1, H2, H2A, H2AX, H2B, H3 또는 H4)는, 양이온성 (및/또는 음이온성) 아미노산 중합체에 컨쥬게이션된다. 예로서, 히스톤 또는 HTP는, 예를 들어 시스테인 잔기를 통해 양이온성 아미노산 중합체 (예

를 들어, 폴리(리신)을 포함하는 것)에 컨쥬게이션될 수 있으며, 중합체 중 리신(들)의 피리딜 디술파이드기(들)은 히스톤 또는 HTP의 시스테인에 대한 디술파이드 결합으로 치환된다.

[0172] *변형된 / 분지 구조*

[0173] 일부 구현예에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 선형 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 분지형 구조를 갖는다.

[0174] 예를 들어, 일부 경우에서, 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, HTP, 예를 들어 시스테인 잔기를 갖는 HTP)는, (예를 들어, 이의 C-말단에서) 양이온성 중합체 (예를 들어, 폴리(L-아르기닌), 폴리(D-리신), 폴리(L-리신), 폴리(D-리신))의 말단에 컨쥬게이션되어, 연장된 선형 폴리펩티드를 형성한다. 일부 경우에서, 하나 이상 (2개 이상, 3개 이상 등)의 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, HTP, 예를 들어 시스테인 잔기를 갖는 HTP)는, (예를 들어, 이의 C-말단에서) 양이온성 중합체 (예를 들어, 폴리(L-아르기닌), 폴리(D-리신), 폴리(L-리신), 폴리(D-리신))의 말단(들)에 컨쥬게이션되어, 연장된 선형 폴리펩티드를 형성한다. 일부 경우에서, 양이온성 중합체는 4,500 - 150,000 Da 범위의 분자량을 갖는다.

[0175] 또 다른 예로서, 일부 경우에서, 하나 이상 (2개 이상, 3개 이상 등)의 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, HTP, 예를 들어 시스테인 잔기를 갖는 HTP)는, (예를 들어, 이의 C-말단에서) 양이온성 중합체 (예를 들어, 폴리(L-아르기닌), 폴리(D-리신), 폴리(L-리신), 폴리(D-리신))의 측쇄에 컨쥬게이션되어, 분지형 구조 (분지형 폴리펩티드)를 형성한다.

[0176] 분지형 구조의 형성은, 일부 경우에서, 달성될 수 있는 (예를 들어, 핵산 페이로드의) 응축량을 증가시킬 수 있다. 따라서, 일부 경우에서, 분지형 구조를 형성하는 구성요소를 사용하는 것이 바람직하다. 다양한 유형의 분지 구조에 관심이 있으며, (예를 들어, HTP, 예를 들어 시스테인 잔기를 갖는 HTP와 같은 대상 양이온성 폴리펩티드; 펩토이드, 폴리아미드 등을 사용하여) 생성될 수 있는 분지 구조의 예에는, 비제한적으로, 브러쉬 중합체, 망 (예를 들어, 거미줄망), 그래프트 중합체, 별모양 중합체, 빗모양 중합체, 중합체 네트워크, 덴드리머 등이 포함된다.

[0177] 예로서, **도 123**에는, 브러쉬 유형의 분지형 구조가 도시되어 있다. 일부 경우에서, 분지형 구조는 2-30개의 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, HTP) (예를 들어, 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 4-30, 4-25, 4-20, 4-15 또는 4-10개의 양이온성 폴리펩티드)를 포함하며, 여기서 각각의 양이온성 폴리펩티드는 분지형 구조의 다른 양이온성 폴리펩티드와 동일하거나 상이할 수 있다 (예를 들어, **도 123** 참조). 일부 경우에서, 양이온성 중합체는 4,500 - 150,000 Da 범위의 분자량을 갖는다. 일부 경우에서, 양이온성 중합체 (예를 들어, 폴리(L-아르기닌), 폴리(D-리신), 폴리(L-리신), 폴리(D-리신))의 측쇄의 5% 이상 (예를 들어, 10% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 40% 이상 또는 50% 이상)이, 대상 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, HTP, 예를 들어 시스테인 잔기를 갖는 HTP)에 컨쥬게이션된다. 일부 경우에서, 양이온성 중합체 (예를 들어, 폴리(L-아르기닌), 폴리(D-리신), 폴리(L-리신), 폴리(D-리신))의 측쇄의 50% 이하 (예를 들어, 40% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하 또는 5% 이하)가, 대상 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, HTP, 예를 들어 시스테인 잔기를 갖는 HTP)에 컨쥬게이션된다. 따라서, HTP는 양이온성 아미노산 중합체와 같은 중합체의 백본에서 분지될 수 있다.

[0178] 일부 경우에서, 분지형 구조의 형성은, 펩토이드 (폴리펩토이드), 폴리아미드, 덴드리머 등과 같은 구성요소를 사용하여 가능해질 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 펩토이드 (예를 들어, 폴리펩토이드)는, 예를 들어, 일부 경우에서 응축을 가능하게 할 수 있는 망 (예를 들어, 거미줄망) 구조를 생성하기 위해, 대상 전달 분자를 갖는 조성물의 일부로서 사용된다.

[0179] 본원에서 천연 또는 변형된 폴리펩티드 서열 중 하나 이상은, 말단 또는 간헐적 아르기닌, 리신 또는 히스티딘 서열로 변형될 수 있다. 하나의 구현예에서, 각각의 폴리펩티드는 나노입자 코어 내에 동일한 아민 몰농도로 포함된다. 이러한 구현예에서, 각각의 폴리펩티드의 C-말단은 5R (5개의 아르기닌)로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 각각의 폴리펩티드의 C-말단은 9R (9개의 아르기닌)로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 각각의 폴리펩티드의 N-말단은 5R (5개의 아르기닌)로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 각각의 폴리펩티드의 N-말단은 9R (9개의 아르기닌)로 변형될 수 있다. 일부 경우에서, H2A, H2B, H3 및/또는 H4 히스톤 단편 (예를 들어, HTP)은 FKFL 카텝신 B 단백질분해 절단 도메인 (서열 번호 182) 또는 RGFFP 카텝신 D 단백질분해 절단 도메인 (서열 번호 183)으로 연속하여 각각 브릿징된다. 일부 경우에서, H2A, H2B, H3 및/또는 H4 히스톤 단편 (예를 들어, HTP)은, 5R (5개의 아르기닌), 9R (9개의 아르기닌), 5K (5개의 리신), 9K (9개의 리신), 5H (5개의 히스티딘) 또는 9H (9개의 히스티딘) 양이온성 스페이서 도메인에 의해 연속으로 브릿징될 수 있다. 일부 경우에

서, 하나 이상의 H2A, H2B, H3 및/또는 H4 히스톤 단편 (예를 들어, HTP)은 이의 N-말단에서 프로타민에 디술파이드-결합된다.

[0180] 분지형 히스톤 구조를 생성하는 방법을 예시하기 위해, 예시 제조 방법이 제공된다. 이러한 방법의 하나의 예에는, 하기가 포함된다: 히스톤 H2AX [134-143], 히스톤 H3 [1-21 Cys], 히스톤 H3 [23-34 Cys], 히스톤 H4 [8-25 WC] 및 SV40 T-Ag-유래 NLS의 등몰비의 공유 결합적 변형이 10% 피리딜 디술파이드 변형된 폴리(L-리신) [MW = 5400, 18000 또는 45000 Da; n = 30, 100 또는 250]을 이용한 반응으로 수행될 수 있다. 전형적인 반응에서, 700 μM Cys-변형된 히스톤/NLS (20 nmol)의 수용액 29 μL를, 0.2 M 인산염 완충액 (pH 8.0) 57 μL에 첨가할 수 있다. 두 번째로, 이어서 100 μM 피리딜 디술파이드 보호된 폴리(리신) 용액 14 μL를 히스톤 용액에 첨가하여, 피리딜 디술파이드기 대 시스테인 잔기의 비가 1:2인 최종 부피 100 μL를 만들 수 있다. 이러한 반응은 실온에서 3시간 동안 수행될 수 있다. 반응은 4회 반복될 수 있으며, 컨쥬게이션 정도는 343nm 에서의 피리딘-2-티온의 흡광도를 통해 결정될 수 있다.

[0181] 또 다른 예로서, 히스톤 H3 [1-21 Cys] 펩티드 및 히스톤 H3 [23-34 Cys] 펩티드의 0:1, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 또는 1:0 몰비의 공유 결합적 변형은, 10% 피리딜 디술파이드 변형된 폴리(L-리신) 또는 폴리(L-아르기닌) [MW = 5400, 18000 또는 45000 Da; n = 30, 100 또는 250]을 이용한 반응으로 수행될 수 있다. 전형적인 반응에서, 700 μM Cys-변형된 히스톤 (20 nmol)의 수용액 29 μL를 0.2 M 인산염 완충액 (pH 8.0) 57 μL에 첨가할 수 있다. 두 번째로, 이어서 100 μM 피리딜 디술파이드 보호된 폴리(리신) 용액 14 μL를 히스톤 용액에 첨가하여, 피리딜 디술파이드기 대 시스테인 잔기의 비가 1:2인 최종 부피 100 μL를 만들 수 있다. 이러한 반응은 실온에서 3시간 동안 수행될 수 있다. 반응은 4회 반복될 수 있으며, 컨쥬게이션 정도는 343nm 에서의 피리딘-2-티온의 흡광도를 통해 결정될 수 있다.

[0182] 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 핵산 페이로드와 응축된다 (예를 들어, 도 1, 패널 E-F 참조). 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 단백질 페이로드와 응축된다. 일부 경우에서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은, 추가된 엔도좀 완충 능력, 안정성, 및 예를 들어 선택적인, 지속적 방출을 제공하기 위해, 실리카, 염, 및/또는 음이온성 중합체와 동시-응축된다. 상기 언급된 바와 같이, 일부 경우에서, 대상 전달 분자의 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은, 예를 들어 일부 4-25개의 아미노산 길이 또는 4-15개의 아미노산 길이로의, 반복되는 양이온성 잔기 (예컨대 아르기닌, 리신 및/또는 히스티딘)의 스트레치(stretch)이다. 이러한 도메인은, 전달 분자가 음이온성 분리 가능(sheddable) 매트릭스 (예를 들어, 동시-응축된 음이온성 중합체)와 정전기적으로 상호작용하도록 할 수 있다. 따라서, 일부 경우에서, 대상 전달 분자의 대상 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인은 음이온성 분리 가능 매트릭스, 및 핵산 및/또는 단백질 페이로드와 (예를 들어, 정전기적으로) 상호작용하는 반복되는 양이온성 잔기의 스트레치이다. 따라서, 일부 경우에서, 대상 전달 분자는 페이로드 (예를 들어, 핵산 및/또는 단백질)과 상호작용하며, 음이온성 중합체를 갖는 조성물의 일부로서 존재한다 (예를 들어, 페이로드 및 음이온성 중합체와 동시-응축함).

[0183] 음이온성 분리 가능 매트릭스의 음이온성 중합체 (즉, 대상 전달 분자의 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인과 상호작용하는 음이온성 중합체)는, 임의의 편리한 음이온성 중합체/중합체 조성물일 수 있다. 예에는, 비제한적으로, 폴리(글루탐산) (예를 들어, 폴리(D-글루탐산) [PDE], 폴리(L-글루탐산) [PLE] (PDE 및 PLE 둘 모두 다양한 목적하는 비로) 등)이 포함된다. 일부 경우에서, PDE는 음이온성 분리 가능 매트릭스 (음이온성 중합체)로서 사용된다. 일부 경우에서, PLE는 음이온성 분리 가능 매트릭스 (음이온성 중합체)로서 사용된다. 일부 경우에서, PLE 및 PDE는 둘 모두, 예를 들어 1:1 비로 (50% PDE, 50% PLE), 음이온성 분리 가능 매트릭스 (음이온성 중합체)로서 사용된다.

[0184] *음이온성 중합체*

[0185] 음이온성 중합체 조성물은 하나 이상의 음이온성 아미노산 중합체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 대상 음이온성 중합체 조성물은 폴리(글루탐산)(PEA), 폴리(아스파르트산)(PDA) 및 이들의 조합으로부터 선택되는 중합체를 포함한다. 일부 경우에서, 주어진 음이온성 아미노산 중합체는 아스파르트산 및 글루탐산 잔기의 혼합물을 포함할 수 있다. 각각의 중합체는 L-이성질체 또는 D-이성질체의 중합체로서 조성물에 존재할 수 있으며, 여기서 D-이성질체가 분해되는데 더 긴 시간이 걸리기 때문에 표적 세포에서 보다 안정하다. 따라서, D-이성질체 폴리(아미노산)의 내포는 분해 및 후속 페이로드 방출을 지연시킬 수 있다. 따라서, 페이로드 방출 속도는 제어될 수 있고, 이는 D-이성질체의 중합체 대 L-이성질체의 중합체의 비에 비례하며, L-이성질체에 대한 D-이성질체의 비율이 높으면 페이로드 방출의 지속 기간이 증가한다 (즉, 방출 속도는 감소함). 즉, D- 및 L- 이성질체의 상대적인 양은 분해 및 페이로드 방출에 대한 나노입자 코어의 지속적 방출 동력학 및 효

소 감수성을 조절할 수 있다.

[0186] 일부 경우에서, 음이온성 중합체 조성물은 음이온성 아미노산 중합체 (예를 들어, 폴리(글루탐산)(PEA) 및 폴리(아스파르트산)(PDA))의 D-이성질체의 중합체 및 L-이성질체의 중합체를 포함한다. 일부 경우에서, D- 대 L-이성질체 비는 10:1-1:10 (예를 들어, 8:1-1:10, 6:1-1:10, 4:1-1:10, 3:1-1:10, 2:1-1:10, 1:1-1:10, 10:1-1:8, 8:1-1:8, 6:1-1:8, 4:1-1:8, 3:1-1:8, 2:1-1:8, 1:1-1:8, 10:1-1:6, 8:1-1:6, 6:1-1:6, 4:1-1:6, 3:1-1:6, 2:1-1:6, 1:1-1:6, 10:1-1:4, 8:1-1:4, 6:1-1:4, 4:1-1:4, 3:1-1:4, 2:1-1:4, 1:1-1:4, 10:1-1:3, 8:1-1:3, 6:1-1:3, 4:1-1:3, 3:1-1:3, 2:1-1:3, 1:1-1:3, 10:1-1:2, 8:1-1:2, 6:1-1:2, 4:1-1:2, 3:1-1:2, 2:1-1:2, 1:1-1:2, 10:1-1:1, 8:1-1:1, 6:1-1:1, 4:1-1:1, 3:1-1:1 또는 2:1-1:1)의 범위 내에 있다.

[0187] 따라서, 일부 경우에서, 음이온성 중합체 조성물은 D-이성질체의 중합체 (예를 들어, 폴리(D-글루탐산) (PDEA) 및 폴리(D-아스파르트산) (PDDA)으로부터 선택됨)인 제1 음이온성 중합체 (예를 들어, 아미노산 중합체)를 포함하고; L-이성질체의 중합체 (예를 들어, 폴리(L-글루탐산) (PLEA) 및 폴리(L-아스파르트산) (PLDA)으로부터 선택됨)인 제2 음이온성 중합체 (예를 들어, 아미노산 중합체)를 포함한다. 일부 경우에서, 제1 음이온성 중합체 (D-이성질체) 대 제2 음이온성 중합체 (L-이성질체)의 비는, 10:1-1:10 (예를 들어, 8:1-1:10, 6:1-1:10, 4:1-1:10, 3:1-1:10, 2:1-1:10, 1:1-1:10, 10:1-1:8, 8:1-1:8, 6:1-1:8, 4:1-1:8, 3:1-1:8, 2:1-1:8, 1:1-1:8, 10:1-1:6, 8:1-1:6, 6:1-1:6, 4:1-1:6, 3:1-1:6, 2:1-1:6, 1:1-1:6, 10:1-1:4, 8:1-1:4, 6:1-1:4, 4:1-1:4, 3:1-1:4, 2:1-1:4, 1:1-1:4, 10:1-1:3, 8:1-1:3, 6:1-1:3, 4:1-1:3, 3:1-1:3, 2:1-1:3, 1:1-1:3, 10:1-1:2, 8:1-1:2, 6:1-1:2, 4:1-1:2, 3:1-1:2, 2:1-1:2, 1:1-1:2, 10:1-1:1, 8:1-1:1, 6:1-1:1, 4:1-1:1, 3:1-1:1 또는 2:1-1:1)의 범위 내에 있다.

[0188] 일부 구현예에서, 음이온성 중합체 조성물은 (예를 들어, 음이온성 중합체의 상기 예 중 임의의 것에 더하여 또는 이를 대신하여), 글리코사미노글리칸, 당단백질, 다당류, 폴리(만누론산), 폴리(굴루론산), 헤파린, 헤파린 술페이트, 콘드로이틴, 콘드로이틴 술페이트, 케라탄, 케라탄 술페이트, 아그레칸, 폴리(글루코사민), 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 음이온성 중합체를 포함한다.

[0189] 일부 구현예에서, 음이온성 중합체는 1-200 kDa (예를 들어, 1-150, 1-100, 1-50, 5-200, 5-150, 5-100, 5-50, 10-200, 10-150, 10-100, 10-50, 15-200, 15-150, 15-100 또는 15-50 kDa) 범위의 분자량을 가질 수 있다. 예로서, 일부 경우에서, 음이온성 중합체는 약 15 kDa의 분자량을 갖는 폴리(글루탐산)을 포함한다.

[0190] 일부 경우에서, 음이온성 아미노산 중합체는, 예를 들어 링커, NLS 및/또는 양이온성 폴리펩티드 (예를 들어, 히스톤 또는 HTP)에의 컨쥬게이션을 가능하게 할 수 있는 시스테인 잔기를 포함한다. 예를 들어, 시스테인 잔기는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 및/또는 아민-반응성 화학을 통해 가교결합 (컨쥬게이션)에 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 음이온성 중합체 조성물의 음이온성 아미노산 중합체 (예를 들어, 폴리(글루탐산) (PEA), 폴리(아스파르트산) (PDA), 폴리(D-글루탐산) (PDEA), 폴리(D-아스파르트산) (PDDA), 폴리(L-글루탐산) (PLEA), 폴리(L-아스파르트산) (PLDA))는, 시스테인 잔기를 포함한다. 일부 경우에서, 음이온성 아미노산 중합체는 N- 및/또는 C- 말단 상에 시스테인 잔기를 포함한다. 일부 경우에서, 음이온성 아미노산 중합체는 내부 시스테인 잔기를 포함한다.

[0191] 일부 경우에서, 음이온성 아미노산 중합체는 핵 위치 신호 (NLS) (하기에 보다 상세하게 기재됨)를 포함한다 (및/또는 이에 컨쥬게이션된다). 따라서, 일부 구현예에서, 음이온성 중합체 조성물의 음이온성 아미노산 중합체 (예를 들어, 폴리(글루탐산) (PEA), 폴리(아스파르트산) (PDA), 폴리(D-글루탐산) (PDEA), 폴리(D-아스파르트산) (PDDA), 폴리(L-글루탐산) (PLEA), 폴리(L-아스파르트산) (PLDA))는, 하나 이상 (예를 들어, 2개 이상, 3개 이상 또는 4개 이상)의 NLS를 포함한다 (및/또는 이에 컨쥬게이션된다). 일부 경우에서, 음이온성 아미노산 중합체는 N- 및/또는 C- 말단 상에 NLS를 포함한다. 일부 경우에서, 음이온성 아미노산 중합체는 내부 NLS를 포함한다.

[0192] 일부 경우에서, 음이온성 중합체는 표적화 리간드에 컨쥬게이션된다.

[0193] *링커*

[0194] 일부 구현예에서, 본 개시에 따른 표적화 리간드는 개재 링커를 통해 페이로드 (예를 들어, 단백질 페이로드 또는 핵산 페이로드, 예컨대 siRNA)에 컨쥬게이션된다 (예를 들어, 도 1 및 도 2 참조). 링커는 단백질 링커 또는 비(非)단백질 링커일 수 있다.

[0195] 표적화 리간드의 링커에의, 링커의 페이로드 (예를 들어, 핵산 또는 단백질 페이로드)에의, 또는 링커의 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에의 컨쥬게이션은, 다수의 상이한 방식으로 달성될 수 있다. 일부 경우에서, 컨쥬게

이션은 술프히드릴 화학을 통해 일어난다 (예를 들어, 2개의 시스테인 잔기 사이의, 예를 들어 디술파이드 결합, 예를 들어 도 2 참조). 일부 경우에서, 컨쥬게이션은 아민-반응성 화학을 사용하여 달성된다. 일부 경우에서, 표적화 리간드는 시스테인 잔기를 포함하고, 시스테인 잔기를 통해 링커에 컨쥬게이션된다. 일부 경우에서, 링커는 펩티드 링커이며, 시스테인 잔기를 포함한다. 일부 경우에서, 표적화 리간드 및 펩티드 링커는 동일한 폴리펩티드의 일부이기 때문에 컨쥬게이션된다.

[0196] 일부 경우에서, 대상 링커는 폴리펩티드이며, 이는 폴리펩티드 링커로 지칭될 수 있다. 폴리펩티드 링커가 고려되지만, 비(非)폴리펩티드 링커 (화학적 링커)가 일부 경우에 사용되는 것으로 이해된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 링커는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커이다. 적합한 단백질 링커는 4개의 아미노산 내지 40개의 아미노산 길이 (예를 들어, 4-30, 4-25, 4-20, 4-15, 4-10, 6-40, 6-30, 6-25, 6-20, 6-15, 6-10, 8-30, 8-25, 8-20 또는 8-15개의 아미노산 길이)의 폴리펩티드를 포함한다.

[0197] 일부 구현예에서, 대상 링커는 강성(rigid) 이다 (예를 들어, 하나 이상의 프롤린 잔기를 포함하는 링커). 강성 링커의 하나의 비제한적인 예는, GAPGAPGAP (서열 번호 17)이다. 일부 경우에서, 폴리펩티드 링커는 N- 또는 C-말단에 C 잔기를 포함한다. 따라서, 일부 경우에, 강성 링커는 GAPGAPGAPC (서열 번호 18) 및 CGAPGAPGAP (서열 번호 19)로부터 선택된다.

[0198] 어느 정도의 가요성을 갖는 펩티드 링커가 사용될 수 있다. 따라서, 일부 경우에서, 대상 링커는 가요성이다. 연결 펩티드는 사실 임의의 아미노산 서열을 가질 수 있으며, 가요성 링커가 일반적으로 가요성 펩티드를 유도하는 서열을 가지고 있을 것이라는 점을 명심해야 한다. 글리신 및 알라닌과 같은 작은 아미노산의 사용은, 가요성 펩티드를 생성하는데 유용하다. 이러한 서열의 형성은 당업자에게 통상적인 것이다. 다양한 상이한 링커가 상업적으로 입수 가능하며, 사용에 적합한 것으로 여겨진다. 예시적인 링커 폴리펩티드에는, 글리신 중합체 $(G)_n$, 글리신-세린 중합체 (예를 들어, $(GS)_n$, $GSGGS_n$ (서열 번호 20), $GGSGGS_n$ (서열 번호 21) 및 $GGGS_n$ (서열 번호 22) 포함, 여기서 n은 적어도 1의 정수임), 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체가 포함된다. 예시적인 링커는, 비제한적으로, GGSG (서열 번호 23), GGSGG (서열 번호 24), GSGSG (서열 번호 25), GSGGG (서열 번호 26), GGGSG (서열 번호 27), GSSSG (서열 번호 28) 등을 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 기재된 임의의 요소에 컨쥬게이션된 펩티드의 설계는 전부 또는 부분적으로 가요성인 링커를 포함할 수 있기 때문에, 상기와 같은 링커가 가요성 링커 뿐 아니라 덜 가요성인 구조를 부여하는 하나 이상의 부분을 포함할 수 있다는 것을 당업자는 인지할 것이다. 가요성 링커의 추가적인 예에는, 비제한적으로, GGGGGSGGGGG (서열 번호 29) 및 GGGGGSGGGGS (서열 번호 30)가 포함된다. 상기 언급된 바와 같이, 일부 경우에서, 폴리펩티드 링커는 N- 또는 C-말단에 C 잔기를 포함한다. 따라서, 일부 경우에서, 가요성 링커는 GGGGGSGGGGGC (서열 번호 31), CGGGGGSGGGGG (서열 번호 32), GGGGGSGGGGSC (서열 번호 33) 및 CGGGGGSGGGGS (서열 번호 34)로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0199] 일부 경우에서, 대상 폴리펩티드 링커는 엔도좀분해성이다. 엔도좀분해성 폴리펩티드 링커에는, 비제한적으로, KALA (서열 번호 35) 및 GALA (서열 번호 36)가 포함된다. 상기 언급된 바와 같이, 일부 경우에서, 폴리펩티드 링커는 N- 또는 C-말단에 C 잔기를 포함한다. 따라서, 일부 경우에서, 대상 링커는 CKALA (서열 번호 37), KALAC (서열 번호 38), CGALA (서열 번호 39) 및 GALAC (서열 번호 40)로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

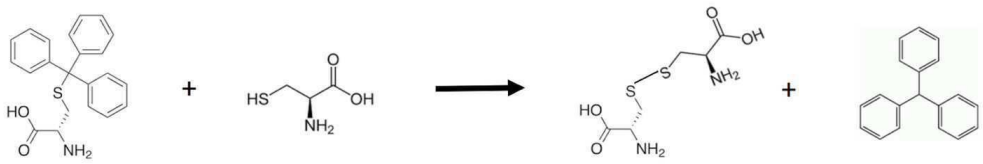
[0200] *술프히드릴 커플링 반응의 예시적인 예*

[0201] (예를 들어, 술프히드릴 화학을 통한 (예를 들어 시스테인 잔기를 사용하는) 컨쥬게이션에 대하여)

[0202] *(예를 들어, 표적화 리간드의 페이로드에의 컨쥬게이션, 표적화 리간드의 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에의 컨쥬게이션, 표적화 리간드의 링커에의 컨쥬게이션, 링커의 페이로드에의 컨쥬게이션, 링커의 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에의 컨쥬게이션에 대하여)*

[0203] *디술파이드 결합*

[0204] 유리(free) 술프히드릴기를 함유하는 환원된 상태의 시스테인 잔기는, 전형적인 디술파이드 교환 반응에서 보호된 티올과 쉽게 디술파이드 결합을 형성한다.

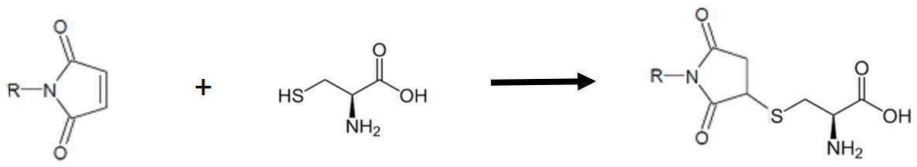


[0205]

[0206] *티오에테르/티오에스테르 결합*

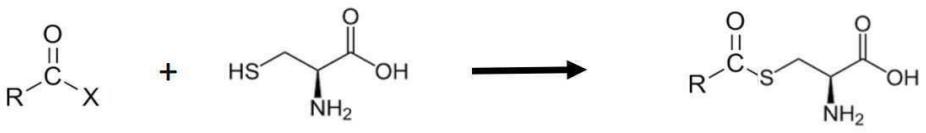
[0207] 시스테인의 술프히드릴기는 말레이미드 및 아실 할라이드기와 반응하여, 각각, 안정한 티오에테르 및 티오에스테르 결합을 형성한다.

[0208] *말레이미드*



[0209]

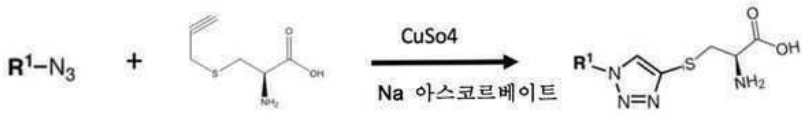
[0210] *아실 할라이드*



[0211]

[0212] *아지드 - 알킨 고리화 첨가*

[0213] 이러한 컨쥬게이션은 알킨 결합을 함유하기 위한 시스테인 잔기의 화학적 변형에 의해, 또는 합성 펩티드 제조에서 L-프로파르길 시스테인의 사용에 의해 (하기 도시됨) 가능하게 된다. 이어서, Cu-촉진 클릭(click) 화학에 의해 커플링이 달성된다.



[0214]

[0215] *전달 분자 및 구성요소의 예시적인 예*

[0216] *(0a) 시스테인 컨쥬게이션 앵커 1 (CCA1)*

[0217] [하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 - 링커 (GAPGAPGAP) - 시스테인]

[0218] RRRRRRRRR GAPGAPGAP C (서열 번호 41)

[0219] *(0b) 시스테인 컨쥬게이션 앵커 2 (CCA2)*

[0220] [시스테인 - 링커 (GAPGAPGAP) - 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인]

[0221] C GAPGAPGAP RRRRRRRRR (서열 번호 42)

[0222] *(1a) α5β1 리간드*

[0223] [하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 - 링커 (GAPGAPGAP) - 표적화 리간드]

[0224] RRRRRRRRR GAPGAPGAP RRETAWA (서열 번호 45)

[0225] *(1b) a5β1 리간드*

[0226] [표적화 리간드 - 링커 (GAPGAPGAP) - 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인]

[0227] RRETAWA GAPGAPGAP RRRRRRRRR (서열 번호 46)

[0228] *(1c) a5β1 리간드 - Cys 좌측*

[0229] CGAPGAPGAP (서열 번호 19)참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA1 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0230] *(1d) a5β1 리간드 - Cys 우측*

[0231] GAPGAPGAPC (서열 번호 18)참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA2 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0232] *(2a) RGD a5β1 리간드*

[0233] [하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 - 링커 (GAPGAPGAP) - 표적화 리간드]

[0234] RRRRRRRRR GAPGAPGAP RGD (서열 번호 47)

[0235] *(2b) RGD a5b1 리간드*

[0236] [표적화 리간드 - 링커 (GAPGAPGAP) - 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인]

[0237] RGD GAPGAPGAP RRRRRRRRR (서열 번호 48)

[0238] *(2c) RGD 리간드 - Cys 좌측*

[0239] CRGD (서열 번호 49)참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA1 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0240] *(2d) RGD 리간드 - Cys 우측*

[0241] RGDC (서열 번호 50)참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA2 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0242] *(3a) 트랜스페린 리간드* [하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 - 링커 (GAPGAPGAP) - 표적화 리간드]

[0243] RRRRRRRRR GAPGAPGAP THRPPMWSPVWP (서열 번호 51)

[0244] *(3b) 트랜스페린 리간드*

[0245] [표적화 리간드 - 링커 (GAPGAPGAP) - 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인]

[0246] THRPPMWSPVWP GAPGAPGAP RRRRRRRRR (서열 번호 52)

[0247] *(3c) 트랜스페린 리간드 - Cys 좌측*

[0248] CTHRPPMWSPVWP (서열 번호 53)

[0249] CPTHRPPMWSPVWP (서열 번호 54)

[0250] 참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA1 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0251] *(3d) 트랜스페린 리간드 - Cys 우측*

[0252] THRPPMWSPVWPC (서열 번호 55)참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA2 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0253] *(4a) E-셀렉틴 리간드 [1-21]*

[0254] [하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 - 링커 (GAPGAPGAP) - 표적화 리간드]

[0255] RRRRRRRRR GAPGAPGAP MIASQFLSALTLVLLIKESGA (서열 번호 56)

[0256] *(4b) E-셀렉틴 리간드 [1-21]*

[0257] [표적화 리간드 - 링커 (GAPGAPGAP) - 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인]

[0258] MIASQFLSALTLVLLIKESGA GAPGAPGAP RRRRRRRRR (서열 번호 57)

[0259] *(4c) E-셀렉틴 리간드 [1-21] - Cys 좌측*

[0260] CMIASQFLSALTLVLLIKESGA (서열 번호 58)

[0261] 참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA1 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0262] *(4d) E-셀렉틴 리간드 [1-21] - Cys 우측*

[0263] MIASQFLSALTLVLLIKESGAC (서열 번호 59)

[0264] 참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA2 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0265] *(5a) FGF 단편 [26-47]*

[0266] [하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 - 링커 (GAPGAPGAP) - 표적화 리간드]

[0267] RRRRRRRRR GAPGAPGAP KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (서열 번호 60)

[0268] 참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA1 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0269] *(5b) FGF 단편 [26-47]*

[0270] [표적화 리간드 - 링커 (GAPGAPGAP) - 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인]

[0271] KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS GAPGAPGAP RRRRRRRRR (서열 번호 61)

[0272] 참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA1 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0273] *(5c) FGF 단편 [25-47] - 좌측의 Cys가 본래의 것임*

[0274] CKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (서열 번호 43)

[0275] 참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA1 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0276] *(5d) FGF 단편 [26-47] - Cys 우측*

[0277] KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKSC (서열 번호 44)

[0278] 참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA2 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0279] *(6a) 엑센딘 (S11C) [1-39]*

[0280] HGEGTFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 번호 2)

[0281] 참고: 이는 술프히드릴 화학 (예를 들어, 디술파이드 결합) 또는 아민-반응성 화학을 통해, CCA1 (상기 참조)에 컨쥬게이션되거나 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0282] *다가 조성물*

[0283] 일부 경우에서, 대상 조성물은, 조성물이 다가 (즉, 예를 들어 다수의 표적화 리간드를 갖기 때문에 하나 초과의 표적을 가짐)가 되도록 전달 분자의 집단을 포함한다. 일부 경우에서, 이러한 조성물은 CD34 및 헤파린 술페이트 프로테오글리칸에 대한 표적화된 결합을 제공하는, 표적화 리간드의 조합을 포함한다. 예를 들어, 폴리(L-아르기닌)은 헤파린 술페이트 프로테오글리칸에 대한 표적화된 결합을 제공하기 위해, 이러한 조성물의 일부

로서 사용될 수 있다. 다가는 또한 동일한 전달 분자의 일부로서 하나 초과의 표적화 리간드를 포함함으로써 달성될 수 있다. 하기 설명은 두 가지 상황 (조성물이 하나 초과의 전달 분자를 포함하는 경우, 및 전달 분자가 하나 초과의 표적화 리간드를 갖는 경우) 모두에 적용하기 위한 것으로 의도된다.

[0284] 일부 구현예에서, 대상 조성물은 (2개 이상의) 표적화 리간드의 집단을 포함하며, 여기서 제1 및 제2 리간드는 상이한 표적을 갖기 때문에, 대상 조성물은 다가이다. 다가 대상 조성물은, 2개 이상의 표적화 리간드를 포함하는 것 (예를 들어, 상이한 리간드를 포함하는 2개 이상의 전달 분자)이다. 다량체성 (이러한 경우 삼량체성) 대상 조성물의 일례는, 표적화 리간드 줄기 세포 인자 (SCF) (c-Kit 수용체를 표적화함, 또한 CD117로 공지됨), CD70 (CD27을 표적화함) 및 SH2 도메인-함유 단백질 1A (SH2D1A) (CD150을 표적화함)를 포함하는 것이다. 예를 들어, 일부 경우에서, 조혈 줄기 세포 (HSC) [KLS (c-Kit^{+} Lin^{-} Sca-1^{+}) 및 CD27^{+}/IL-7Ra^{-}/CD150^{+}/CD34^{-}]를 표적화하기 위해, 대상 조성물은, c-Kit, CD27 및 CD150을 각각 표적으로 하는, 표적화 리간드 SCF, CD70 및 SH2 도메인-함유 단백질 1A (SH2D1A)의 조합을 포함하는, 표면 코트를 포함한다 (예를 들어, 표 1 참조). 일부 경우에서, 이러한 조성물은 다른 림프성 및 골수성 전구세포에 비해, HSPC 및 장기(long-term) HSC (c-Kit+/Lin-/Sca-1+/CD27+/IL-7Ra-/CD150+/CD34-)를 선택적으로 표적화할 수 있다.

[0285] 일부 예시 구현예에서, 3개의 표적화 리간드 (SCF, CD70 및 SH2D1A)는 모두 대상 조성물의 일부이다. 예를 들어, (1) 표적화 폴리펩티드 SCF (c-Kit 수용체를 표적화함)는 **X***M*EGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLPSHCWISEMVVQLSDSLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVASETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVA**X** (서열 번호 167)를 포함할 수 있으며, 여기서 X는, 예를 들어 일부 경우에서 N- 및/또는 C-말단에 존재할 수 있거나, 폴리펩티드 서열 내 삽입될 수 있는, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 (예를 들어, 6H와 같은 폴리-히스티딘, 9R과 같은 폴리-아르기닌 등)이고; (2) 표적화 폴리펩티드 CD70 (CD27을 표적화함)은 **X**PEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP**X** (서열 번호 168)를 포함할 수 있으며, 여기서 X는, 예를 들어 일부 경우에서 N- 및/또는 C-말단에 존재할 수 있거나, 폴리펩티드 서열 내 삽입될 수 있는, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 (예를 들어, 6H와 같은 폴리-히스티딘, 9R과 같은 폴리-아르기닌 등)이고; (3) 표적화 폴리펩티드 SH2D1A (CD150을 표적화함)는 **X***SSGLVPRGSH*MDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGVYCLCVLYHGYIYTYRVSQTETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPLQYPVEKKSS*ARSTQGTTGIREDPDVCLKAP* (서열 번호 169)를 포함할 수 있으며, 여기서 X는, 예를 들어 일부 경우에서 N- 및/또는 C-말단에 존재할 수 있거나, 또는 (예를 들어, *MGSS***X***SSGLVPRGSH*MDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGVYCLCVLYHGYIYTYRVSQTETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPLQYPVEKKSSARSTQGTTGIREDPDVCLKAP (서열 번호 171)와 같은) 폴리펩티드 서열 내 삽입될 수 있는, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인 (예를 들어, 6H와 같은 폴리-히스티딘, 9R과 같은 폴리-아르기닌 등)이다.

[0286] 상기 언급된 바와 같이, 본 개시의 조성물은 목적하는 세포 유형을 표적화하거나, 목적하는 세포 유형의 조합을 표적화하기 위해 다수의 표적화 리간드를 포함할 수 있다. 관심있는 (마우스 및 인간 조혈 세포 계통의) 표적화 리간드의 다양한 조합의 예에는, 비제한적으로, 하기가 포함된다: [마우스] (i) CD150; (ii) Sca1, cKit, CD150; (iii) CD150 및 CD49b; (iv) Sca1, cKit, CD150 및 CD49b; (v) CD150 및 Flt3; (vi) Sca1, cKit, CD150 및 Flt3; (vii) Flt3 및 CD34; (viii) Flt3, CD34, Sca1 및 cKit; (ix) Flt3 및 CD127; (x) Sca1, cKit, Flt3 및 CD127; (xi) CD34; (xii) cKit 및 CD34; (xiii) CD16/32 및 CD34; (xiv) cKit, CD16/32 및 CD34; 및 (xv) cKit; 및 [인간] (i) CD90 및 CD49f; (ii) CD34, CD90 및 CD49f; (iii) CD34; (iv) CD45RA 및 CD10; (v) CD34, CD45RA 및 CD10; (vi) CD45RA 및 CD135; (vii) CD34, CD38, CD45RA 및 CD135; (viii) CD135; (ix) CD34, CD38 및 CD135; 및 (x) CD34 및 CD38. 따라서, 일부 경우에서, 대상 조성물은 하기로부터 선택되는, 표면 단백질 또는 표면 단백질의 조합에 대한 표적화된 결합을 제공하는 하나 이상의 표적화 리간드를 포함한다: [마우스] (i) CD150; (ii) Sca1, cKit, CD150; (iii) CD150 및 CD49b; (iv) Sca1, cKit, CD150 및 CD49b; (v) CD150 및 Flt3; (vi) Sca1, cKit, CD150 및 Flt3; (vii) Flt3 및 CD34; (viii) Flt3, CD34, Sca1 및 cKit; (ix) Flt3 및 CD127; (x) Sca1, cKit, Flt3 및 CD127; (xi) CD34; (xii) cKit 및 CD34; (xiii) CD16/32 및 CD34; (xiv) cKit, CD16/32 및 CD34; 및 (xv) cKit; 및 [인간] (i) CD90 및 CD49f; (ii) CD34, CD90 및 CD49f; (iii) CD34; (iv) CD45RA 및 CD10; (v) CD34, CD45RA 및 CD10; (vi) CD45RA 및 CD135; (vii) CD34, CD38, CD45RA 및 CD135; (viii) CD135; (ix) CD34, CD38 및 CD135; 및 (x) CD34 및 CD38. 대상 조성물이 하나 초과의 표적화 리간드를 포함할 수 있고, 일부 세포가 중복되는 마커를 포함할 수 있기 때문에, 다수의 상이한 세포 유형은 전달 분자 및/또는 표적화 리간드의 조합을 사용하여 표적화될 수 있으며, 예를 들어, 일부

경우에서 조성물은 하나의 특정 세포 유형을 표적화할 수 있지만, 다른 경우에서 조성물은 하나 초과의 특정 세포 유형 (예를 들어, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상의 세포 유형)을 표적화할 수 있다. 예를 들어, 조혈 계통 내 세포의 임의의 조합이 표적화될 수 있다. 예시적인 예로서, (CD34에 대한 표적화된 결합을 제공하는 표적화 리간드를 사용하는) CD34의 표적화는, 조혈 계통 내 몇몇의 상이한 세포로 페이로드의 전달을 유도할 수 있다.

[0287] *페이로드*

[0288] 본 개시의 전달 분자는 페이로드에 컨쥬게이션되거나, 또는 일부 경우에서 페이로드와 정전기적으로 상호작용할 수 있다 (예를 들어, 이와 응축됨). 페이로드는 핵산 및/또는 단백질로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 대상 전달 분자는 핵산 페이로드 (예를 들어, DNA 및/또는 RNA)를 전달하는데 사용된다. 핵산 페이로드는 임의의 관심 핵산일 수 있고, 예를 들어 핵산 페이로드는 선형 또는 원형일 수 있으며, 플라스미드, 바이러스 게놈, RNA (예를 들어, mRNA와 같은 코딩 RNA, 또는 가이드 RNA, 짧은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로RNA (miRNA)등과 같은 비(非)코딩 RNA), DNA 등일 수 있다. 일부 경우에서, 핵산 페이로드는 RNAi 작용제 (예를 들어, shRNA, siRNA, miRNA 등) 또는 RNAi 작용제를 인코딩하는 DNA 템플릿이다. 일부 경우에서, 핵산 페이로드는 siRNA 분자 (예를 들어, mRNA를 표적화하는 것, miRNA를 표적화하는 것)이다. 일부 경우에서, 핵산 페이로드는 LNA 분자 (예를 들어, miRNA를 표적화하는 것)이다. 일부 경우에서, 핵산 페이로드는 miRNA이다. 일부 경우에서, 핵산 페이로드는 관심 단백질 (예를 들어, 하나 이상의 재프로그램화 및/또는 전환분화(transdifferenciation) 인자, 예컨대 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog 및 Lin28 (예를 들어, 단독으로, 또는 (i) Oct4, Sox2, Klf4 및 c-Myc; (ii) Oct4, Sox2, Nanog 및 Lin28 등과 같은 임의의 목적하는 조합으로); 엔도뉴클레아제 편집용 유전자; 치료용 단백질 등)을 인코딩하는 mRNA를 포함한다. 일부 경우에서, 핵산 페이로드는 비코딩 RNA (예를 들어, RNAi 작용제, CRISPR/Cas 가이드 RNA 등) 및/또는 비코딩 RNA를 인코딩하는 DNA 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 페이로드는 (예를 들어, 표적 세포의 생존 또는 거동을 조절하기 위해) IL2Rα 및 IL12Rɣ를 인코딩하는 핵산 (DNA 및/또는 mRNA)을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 페이로드는 (예를 들어, Fas 또는 TNFα 수용체의 개입으로 인한 표적 세포의 아폽토시스(apoptosis)를 방지하기 위해) BCL-XL를 인코딩하는 핵산 (DNA 및/또는 mRNA)을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 페이로드는 (예를 들어, 표적화된 T-세포에서 면역 효과기 표현형을 촉진시키기 위해) Foxp3을 인코딩하는 핵산 (DNA 및/또는 mRNA)을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 페이로드는 SCF를 인코딩하는 핵산 (DNA 및/또는 mRNA)을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 페이로드는 HoxB4를 인코딩하는 핵산 (DNA 및/또는 mRNA)을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 페이로드는 SIRT6을 인코딩하는 핵산 (DNA 및/또는 mRNA)을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 페이로드는 miR-155와 같은 마이크로RNA를 표적화하는 (이의 발현을 감소시키는) 핵산 분자 (예를 들어, siRNA, LNA 등)를 포함한다 (예를 들어, MiR Base 수탁번호: MI0000681 및 MI0000177 참조). 일부 구현예에서, 핵산 페이로드는 ku70을 표적화하는 siRNA 및/또는 ku80을 표적화하는 siRNA를 포함한다.

[0289] 용어 "핵산 페이로드"는, 변형된 핵산을 포함한다. 마찬가지로, 용어 "RNAi 작용제" 및 "siRNA"는, 변형된 핵산을 포함한다. 예를 들어, 핵산 분자는 모방물일 수 있으며, 이는 변형된 당 백본, 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드간 연결 (예를 들어, 하나 이상의 포스포로티오에이트 및/또는 헤테로원자 뉴클레오시드간 연결), 하나 이상의 변형된 염기 등을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상 페이로드는 삼중체-형성 펩티드 핵산 (PNA)을 포함한다 (예를 들어, [McNeer et al., Gene Ther. 2013 Jun;20(6):658-69] 참조). 따라서, 일부 경우에서, 대상 코어는 PNA를 포함한다. 일부 경우에서, 대상 코어는 PNA 및 DNA를 포함한다.

[0290] 대상 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)는 모르폴리노 백본 구조를 가질 수 있다. 일부 경우에서, 대상 핵산 페이로드 (예를 들어, siRNA)는 하나 이상의 잠금 핵산 (LNA)을 가질 수 있다. 적합한 당 치환기에는, 메톡시 ($-O-CH_3$), 아미노프로폭시 ($--O\ CH_2\ CH_2\ CH_2NH_2$), 알릴 ($-CH_2-CH=CH_2$), -O-알릴 ($--O--\ CH_2-CH=CH_2$) 및 플루오로 (F)가 포함된다. 2'-당 치환기는 아라비노 (위) 위치 또는 리보 (아래) 위치에 있을 수 있다. 적합한 염기 변형에는, 하기와 같은 합성 및 천연 핵염기가 포함된다: 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-히드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 ($-C=C-CH_3$) 우라실 및 시토신, 및 피리미딘 염기의 다른 알키닐 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (유사우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌. 추가의 변형된 핵염기에는, 트리시클릭 피리미딘, 예컨대 페녹사진 시티딘(1H-피리미도(5,4-b)(1,4)벤족사진-2(3H)-온), 페노티아진 시티딘 (1H-피리미도(5,4-b)(1,4)벤조티아진-

2(3H)-온), G-클램프, 예컨대 치환된 페녹사진 시티딘 (예를 들어 9-(2-아미노에톡시)-H-피리미도(5,4-(b)(1,4)벤족사진-2(3H)-온), 카르바졸 시티딘 (2H-피리미도(4,5-b)인돌-2-온), 피리도인돌 시티딘 (H-피리도(3',2':4,5) 피롤로 (2,3-d)피리미딘-2-온)이 포함된다.

[0291] 일부 경우에서, 핵산 페이로드는 컨쥬게이트 모이어티 (예를 들어, 핵산 페이로드의 활성, 안정성, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증진시키는 것)를 포함할 수 있다. 이러한 모이어티 또는 컨쥬게이트는 1차 또는 2차 히드록실기와 같은 관능기에 공유 결합된 컨쥬게이트기를 포함할 수 있다. 컨쥬게이트기에는, 비제한적으로, 인터칼레이터, 리포터 분자, 폴리아민, 폴리아미드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에테르, 올리고머의 약력학적 특성을 증진시키는 기, 및 올리고머의 약동학적 특성을 증진시키는 기가 포함된다. 적합한 컨쥬게이트기에는, 비제한적으로, 콜레스테롤, 지질, 인지질, 비오틴, 페나진, 폴레이트, 페난트리딘, 안트라퀴논, 아크리딘, 플루오레세인, 로다민, 쿠마린 및 염료가 포함된다. 약력학적 특성을 증진시키는 기에는, 흡수를 개선시키고, 분해에 대한 내성을 증진시키고/시키거나, 표적 핵산과의 서열-특이적 하이브리드화를 강화시키는 기가 포함된다. 약동학적 특성을 증진시키는 기에는, 대상 핵산의 흡수, 분포, 대사 또는 배설을 개선시키는 기가 포함된다.

[0292] 임의의 편리한 폴리뉴클레오티드가 대상 핵산 페이로드로서 사용될 수 있다. 예에는, 비제한적으로, 하기가 포함된다: RNA 및 DNA의 종, 예컨대 mRNA, m1A 변형된 mRNA (아데노신의 위치 1에서의 단일메틸화), siRNA, miRNA, 압타머, shRNA, AAV-유래 핵산 및 스캐폴드, 모르폴리노 RNA, 펩토이드 및 펩티드 핵산, cDNA, DNA 오리가미(origami), 합성 뉴클레오티드를 갖는 DNA 및 RNA, 사전 정의된 2차 구조를 갖는 DNA 및 RNA, 상기 언급된 것들의 다량체 및 올리고머, 및 페이로드로서, 이의 서열이 발현이 요구되는 임의의 단백질 또는 폴리펩티드와 같은 다른 산물을 인코딩할 수 있는 페이로드.

[0293] 일부 경우에서, 대상 전달 분자의 페이로드는 단백질을 포함한다. 단백질 페이로드의 예에는, 비제한적으로, 하기가 포함된다: 프로그램화 가능한 유전자 편집 단백질 (예를 들어, 전사 활성제-유사 (TAL) 효과기 (TALE), TALE 뉴클레아제 (TALEN), 아연 핑거 단백질 (ZFP), 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), DNA-가이드된 폴리펩티드, 예컨대 나트로노박테리움 그레고리 아르고나우트 (*Natronobacterium gregoryi* Argonaute) (NgAgo), CRISPR/Cas RNA-가이드된 폴리펩티드, 예컨대 Cas9, CasX, CasY, Cpf1 등); 트랜스포존 (예를 들어, 클래스 I 또는 클래스 II 트랜스포존 - 예를 들어, 피기백(piggybac), 슬리핑 뷰티, Tc1/마리너(mariner), Tol2, PIF/하빈저(harbinger), hAT, 돌연변이체(mutator), 메를린(merlin), 트랜십(transib), 헬리트론(helitron), 마베릭(maverick), 프로그 프린스(frog prince), 미노스(minos), Himar1 등); 메가뉴클레아제 (예를 들어, I-SceI, I-CeuI, I-CreI, I-DmoI, I-ChuI, I-DirI, I-FlmuI, I-FlmuII, I-AniI, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-PanII, I-PanMI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-LtrI, I-GpiI, I-GZeI, I-OnuI, I-HjeMI, I-MsoI, I-TevI, I-TevII, I-TevIII, PI-MleI, PI-MtuI, PI-PspI, PI-Tli I, PI-Tli II, PI-SceV 등); 메가TAL (예를 들어 [Boissel et al., Nucleic Acids Res. 2014 Feb; 42(4): 2591-2601] 참조); SCF; BCL-XL; Foxp3; HoxB4; 및 SiRT6. 상기 단백질 중 임의의 것에 대하여, 대상 전달 분자의 페이로드는 단백질을 인코딩하는 핵산 (DNA 및/또는 mRNA)을 포함할 수 있고/있거나, 실제 단백질을 포함할 수 있다.

[0294] *유전자 편집 도구*

[0295] 일부 경우에서, 핵산 페이로드는 유전자 편집 도구 (즉, 유전자 편집 시스템의 구성요소, 예를 들어 프로그램화 가능한 유전자 편집 시스템과 같은 부위 특이적 유전자 편집 시스템)을 포함하거나 이를 인코딩한다. 예를 들어, 핵산 페이로드는 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (i) CRISPR/Cas 가이드 RNA, (ii) CRISPR/Cas 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA, (iii) 프로그램화 가능한 유전자 편집 단백질, 예컨대 아연 핑거 단백질 (ZFP) (예를 들어, 아연 핑거 뉴클레아제 - ZFN), 전사 활성제-유사 효과기 (TALE) 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제에 융합된 것 - TALEN), DNA-가이드된 폴리펩티드, 예컨대 나트로노박테리움 그레고리 아르고나우트 (*Natronobacterium gregoryi* Argonaute) (NgAgo) 및/또는 CRISPR/Cas RNA-가이드된 폴리펩티드 (예를 들어, Cas9, CasX, CasY, Cpf1 등)를 인코딩하는 DNA 및/또는 RNA; (iv) DNA 공여체 템플릿; (v) 부위-특이적 레콤비나아제 (recombinase) (예를 들어, Cre 레콤비나아제, Dre 레콤비나아제, Flp 레콤비나아제, KD 레콤비나아제, B2 레콤비나아제, B3 레콤비나아제, R 레콤비나아제, Hin 레콤비나아제, Tre 레콤비나아제, PhiC31 인테그라아제 (integrase), Bxb1 인테그라아제, R4 인테그라아제, 람다 인테그라아제, HK022 인테그라아제, HP1 인테그라아제 등)를 인코딩하는 핵산 분자 (DNA, RNA); (vi) 리졸바아제(resolvase) 및/또는 인버타아제(invertase) (예를 들어, Gin, Hin, γδ3, Tn3, Sin, 베타 등)를 인코딩하는 DNA; 및 (vii) 트랜스포존 및/또는 트랜스포존에서 유도된 DNA (예를 들어, 박테리아 트랜스포존, 예컨대 Tn3, Tn5, Tn7, Tn9, Tn10, Tn903, Tn1681 등; 진핵생물 트랜스포존, 예컨대 Tc1/마리너 수퍼패밀리 트랜스포존, 피기백 수퍼패밀리 트랜스포존, hAT 수퍼패밀리 트랜스

포존, 피기백, 슬리핑 뷰티, 프로그 프린스, 미노스, Himar1 등). 일부 경우에서, 대상 전달 분자는, 단백질 페이로드, 예를 들어 유전자 편집 단백질, 예컨대 ZFP (예를 들어, ZFN), TALE (예를 들어, TALEN), DNA-가이드된 폴리펩티드, 예컨대 나트로노박테리움 그레고리 아르고나우트 (*Natronobacterium gregoryi* Argonaute) (NgAgo), CRISPR/Cas RNA-가이드된 폴리펩티드 (예를 들어, Cas9, CasX, CasY, Cpf1 등), 부위-특이적 레콤비나아제 (예를 들어, Cre 레콤비나아제, Dre 레콤비나아제, Flp 레콤비나아제, KD 레콤비나아제, B2 레콤비나아제, B3 레콤비나아제, R 레콤비나아제, Hin 레콤비나아제, Tre 레콤비나아제, PhiC31 인테그라아제, Bxb1 인테그라아제, R4 인테그라아제, 람다 인테그라아제, HK022 인테그라아제, HP1 인테그라아제 등), 리졸바아제 / 인버타아제 (예를 들어, Gin, Hin, γδ3, Tn3, Sin, 베타 등); 및/또는 트랜스포사아제(transposase) (예를 들어, 박테리아 트랜스포존, 예컨대 Tn3, Tn5, Tn7, Tn9, Tn10, Tn903, Tn1681 등; 또는 진핵생물 트랜스포존, 예컨대 Tc1/마리너 수퍼패밀리 트랜스포존, 피기백 수퍼패밀리 트랜스포존, hAT 수퍼패밀리 트랜스포존, 피기백, 슬리핑 뷰티, 프로그 프린스, 미노스, Himar1 등과 관련된 트랜스포존과 관련된 트랜스포사아제)를 전달하는데 사용된다. 일부 경우에서, 전달 분자는 핵산 페이로드 및 단백질 페이로드를 전달하는데 사용되고, 일부 이러한 경우에, 페이로드는 리보핵단백질 복합체 (RNP)를 포함한다.

[0296] 시스템의 성질 및 목적하는 결과에 따라, 유전자 편집 시스템 (예를 들어 프로그램화 가능한 유전자 편집 시스템과 같은 부위 특이적 유전자 편집 시스템)은, 단일 구성요소 (예를 들어, ZFP, ZFN, TALE, TALEN, 부위-특이적 레콤비나아제, 리졸바아제 / 인테그라아제, 트랜스포사아제, 트랜스포존 등)를 포함할 수 있거나, 또는 다수의 구성요소를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 유전자 편집 시스템은 적어도 2개의 구성요소를 포함한다. 예를 들어, 일부 경우에서, 유전자 편집 시스템 (예를 들어 프로그램화 가능한 유전자 편집 시스템)은, (i) 공여체 템플릿 핵산; 및 (ii) 유전자 편집 단백질 (예를 들어, 프로그램화 가능한 유전자 편집 단백질, 예컨대 ZFP, ZFN, TALE, TALEN, DNA-가이드된 폴리펩티드, 예컨대 나트로노박테리움 그레고리 아르고나우트 (*Natronobacterium gregoryi* Argonaute) (NgAgo), CRISPR/Cas RNA-가이드된 폴리펩티드, 예컨대 Cas9, CasX, CasY 또는 Cpf1 등), 또는 유전자 편집 단백질을 인코딩하는 핵산 분자 (예를 들어, DNA 또는 RNA, 예컨대 플라스미드 또는 mRNA)를 포함한다. 또 다른 예로서, 일부 경우에서, 유전자 편집 시스템 (예를 들어 프로그램화 가능한 유전자 편집 시스템)은, (i) CRISPR/Cas 가이드 RNA, 또는 CRISPR/Cas 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA; 및 (ii) CRISPR/Cas RNA-가이드된 폴리펩티드 (예를 들어, Cas9, CasX, CasY, Cpf1 등), 또는 RNA-가이드된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자 (예를 들어, DNA 또는 RNA, 예컨대 플라스미드 또는 mRNA)를 포함한다. 또 다른 예로서, 일부 경우에서, 유전자 편집 시스템 (예를 들어 프로그램화 가능한 유전자 편집 시스템)은, (i) NgAgo-유사 가이드 DNA; 및 (ii) DNA-가이드된 폴리펩티드 (예를 들어, NgAgo), 또는 DNA-가이드된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자 (예를 들어, DNA 또는 RNA, 예컨대 플라스미드 또는 mRNA)를 포함한다. 일부 경우에서, 유전자 편집 시스템 (예를 들어 프로그램화 가능한 유전자 편집 시스템)은, 적어도 3개의 구성요소: (i) 공여체 DNA 템플릿; (ii) CRISPR/Cas 가이드 RNA, 또는 CRISPR/Cas 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA; 및 (iii) CRISPR/Cas RNA-가이드된 폴리펩티드 (예를 들어, Cas9, CasX, CasY 또는 Cpf1), 또는 RNA-가이드된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자 (예를 들어, DNA 또는 RNA, 예컨대 플라스미드 또는 mRNA)를 포함한다. 일부 경우에서, 유전자 편집 시스템 (예를 들어 프로그램화 가능한 유전자 편집 시스템)은, 적어도 3개의 구성요소: (i) 공여체 DNA 템플릿; (ii) NgAgo-유사 가이드 DNA, 또는 NgAgo-유사 가이드 DNA를 인코딩하는 DNA; 및 (iii) DNA-가이드된 폴리펩티드 (예를 들어, NgAgo), 또는 DNA-가이드된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자 (예를 들어, DNA 또는 RNA, 예컨대 플라스미드 또는 mRNA)를 포함한다.

[0297] 일부 구현예에서, 대상 전달 분자는 유전자 편집 도구를 전달하는데 사용된다. 즉, 일부 경우에서, 페이로드는 하나 이상의 유전자 편집 도구를 포함한다. 용어 "유전자 편집 도구"는, 본원에서 유전자 편집 시스템의 하나 이상의 구성요소를 지칭하는데 사용된다. 따라서, 일부 경우에서, 페이로드는 유전자 편집 시스템을 포함하고, 일부 경우에서, 페이로드는 유전자 편집 시스템의 하나 이상의 구성요소 (즉, 하나 이상의 유전자 편집 도구)를 포함한다. 예를 들어, 표적 세포는 유전자 편집 시스템의 구성요소 중 하나를 이미 포함할 수 있기 때문에, 사용자는 단지 나머지 구성요소만 부가하면 된다. 이러한 경우에, 대상 전달 분자의 페이로드는 반드시 주어진 유전자 편집 시스템의 구성요소를 모두 포함하지는 않는다. 이와 같이, 일부 경우에서, 페이로드는 하나 이상의 유전자 편집 도구를 포함한다.

[0298] 예시적인 예로서, 표적 세포는 유전자 편집 단백질 (예를 들어, ZFP, TALE, DNA-가이드된 폴리펩티드 (예를 들어, NgAgo), CRISPR/Cas RNA-가이드된 폴리펩티드, 예컨대 Cas9, CasX, CasY, Cpf1 등, 부위-특이적 레콤비나아제, 예컨대 Cre 레콤비나아제, Dre 레콤비나아제, Flp 레콤비나아제, KD 레콤비나아제, B2 레콤비나아제, B3 레콤비나아제, R 레콤비나아제, Hin 레콤비나아제, Tre 레콤비나아제, PhiC31 인테그라아제, Bxb1 인테그라아제, R4 인테그라아제, 람다 인테그라아제, HK022 인테그라아제, HP1 인테그라아제 등, 리졸바아제 /

인버타아제, 예컨대 Gin, Hin, γδ3, Tn3, Sin, 베타 등, 트랜스포사아제 등) 및/또는 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 RNA를 이미 포함할 수 있기 때문에, 페이로드는 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (i) 공여체 템플릿; 및 (ii) CRISPR/Cas 가이드 RNA, 또는 CRISPR/Cas 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA; 또는 NgAgo-유사 가이드 DNA. 마찬가지로, 표적 세포는 CRISPR/Cas 가이드 RNA 및/또는 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA 또는 NgAgo-유사 가이드 DNA를 이미 포함할 수 있기 때문에, 페이로드는 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (i) 공여체 템플릿; 및 (ii) CRISPR/Cas RNA-가이드된 폴리펩티드 (예를 들어, Cas9, CasX, CasY, Cpf1 등), 또는 RNA-가이드된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자 (예를 들어, DNA 또는 RNA, 예컨대 플라스미드 또는 mRNA); 또는 DNA-가이드된 폴리펩티드 (예를 들어, NgAgo), 또는 DNA-가이드된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자.

[0299] 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 유전자 편집 시스템이 핵산을 '편집'하는 시스템이 될 필요는 없다. 예를 들어, 유전자 편집 시스템은 표적 DNA에서 이중 가닥 절단 (DSB)을 생성하지 않고, 다양한 방식으로 표적 핵산 (예를 들어, DNA 및/또는 RNA)을 변형시키는데 사용될 수 있다고 널리 인식된다. 예를 들어, 일부 경우에서, 이중 가닥 표적 DNA는 칼자국이 생기고(nicked) (하나의 가닥이 절단됨), 일부 경우에서 (예를 들어, 일부 경우에서, 유전자 편집 단백질이 뉴클레아제 활성이 없는 경우, 예를 들어 CRISPR/Cas RNA-가이드된 폴리펩티드는 촉매적 뉴클레아제 도메인에서 돌연변이를 가질 수 있음), 표적 핵산은 전혀 절단되지 않는다. 예를 들어, 일부 경우에서, CRISPR/Cas 단백질 (예를 들어, Cas9, CasX, CasY, Cpf1)은 뉴클레아제 활성 유무에 관계없이, 이종 단백질 도메인에 융합된다. 이종 단백질 도메인은 융합 단백질에 하기와 같은 활성을 제공할 수 있다: 예컨대 (i) DNA-변형 활성 (예를 들어, 뉴클레아제 활성, 메틸트랜스퍼라아제 활성, 데메틸라아제 활성, DNA 복구 활성, DNA 손상 활성, 탈아민화 활성, 디스뮤타아제 활성, 알킬화 활성, 탈퓨린화 활성, 산화 활성, 피리미딘 이량체 형성 활성, 인테그라아제 활성, 트랜스포사아제 활성, 레콤비나아제 활성, 폴리머라아제 활성, 리가아제 활성, 헬리카아제 활성, 포토리아제(photolyase) 활성 또는 글리코실라아제(glycosylase) 활성), (ii) 전사 조절 활성 (예를 들어, 전사 억제제 또는 활성제로의 융합), 또는 (iii) 표적 DNA와 관련된 단백질 (예를 들어, 히스톤)을 변형시키는 활성 (예를 들어, 메틸트랜스퍼라아제 활성, 데메틸라아제 활성, 아세틸트랜스퍼라아제 활성, 데아세틸라아제 활성, 키나아제 활성, 포스파타아제 활성, 유비퀴틴 리가아제 활성, 탈유비퀴틴화 활성, 아데닐화 활성, 탈아데닐화 활성, SUMO화 활성, 탈SUMO화 활성, 리보실화 활성, 탈리보실화 활성, 미리스토일화 활성 또는 탈미리스토일화 활성). 이와 같이, 유전자 편집 시스템은 표적 핵산을 절단하지 않는 방식으로 표적 핵산을 변형시키는 적용에 사용될 수 있고, 또한 표적 DNA로부터의 전사를 조절하는 적용에 사용될 수도 있다.

[0300] 프로그램화 가능한 유전자 편집 도구 (예를 들어, CRISPR/Cas RNA-가이드된 단백질, 예컨대 Cas9, CasX, CasY 및 Cpf1, 아연 핑거 단백질, 예컨대 아연 핑거 뉴클레아제, TALE 단백질, 예컨대 TALEN, CRISPR/Cas 가이드 RNA 등)와 관련된 추가적인 정보에 대해서는, 하기를 참조한다: 예를 들어, [Dreier, et al., (2001) J Biol Chem 276:29466-78]; [Dreier, et al., (2000) J Mol Biol 303:489-502]; [Liu, et al., (2002) J Biol Chem 277:3850-6]; [Dreier, et al., (2005) J Biol Chem 280:35588-97]; [Jamieson, et al., (2003) Nature Rev Drug Discov 2:361-8]; [Durai, et al., (2005) Nucleic Acids Res 33:5978-90]; [Segal, (2002) Methods 26:76-83]; [Porteus and Carroll, (2005) Nat Biotechnol 23:967-73]; [Pabo, et al., (2001) Ann Rev Biochem 70:313-40]; [Wolfe, et al., (2000) Ann Rev Biophys Biomol Struct 29:183-212]; [Segal and Barbas, (2001) Curr Opin Biotechnol 12:632-7]; [Segal, et al., (2003) Biochemistry 42:2137-48]; [Beerli and Barbas, (2002) Nat Biotechnol 20:135-41]; [Carroll, et al., (2006) Nature Protocols 1:1329]; [Ordiz, et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:13290-5]; [Guan, et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:13296-301]; [Sanjana et al., Nature Protocols, 7:171-192 (2012)]; [Zetsche et al, Cell. 2015 Oct 22;163(3):759-71]; [Makarova et al, Nat Rev Microbiol. 2015 Nov;13(11):722-36]; [Shmakov et al., Mol Cell. 2015 Nov 5;60(3):385-97]; [Jinek et al., Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21]; [Chylinski et al., RNA Biol. 2013 May;10(5):726-37]; [Ma et al., Biomed Res Int. 2013;2013:270805]; [Hou et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Sep 24;110(39):15644-9]; [Jinek et al., Elife. 2013;2:e00471]; [Pattanayak et al., Nat Biotechnol. 2013 Sep;31(9):839-43]; [Qi et al, Cell. 2013 Feb 28;152(5):1173-83]; [Wang et al., Cell. 2013 May 9;153(4):910-8]; [Auer et. al., Genome Res. 2013 Oct 31]; [Chen et. al., Nucleic Acids Res. 2013 Nov 1;41(20):e19]; [Cheng et. al., Cell Res. 2013 Oct;23(10):1163-71]; [Cho et. al., Genetics. 2013 Nov;195(3):1177-80]; [DiCarlo et al., Nucleic Acids Res. 2013 Apr;41(7):4336-43]; [Dickinson et. al., Nat Methods. 2013 Oct;10(10):1028-34]; [Ebina et. al., Sci Rep. 2013;3:2510]; [Fujii et. al, Nucleic Acids Res. 2013 Nov 1;41(20):e187]; [Hu et. al., Cell Res. 2013 Nov;23(11):1322-5]; [Jiang et. al., Nucleic Acids Res. 2013 Nov 1;41(20):e188]; [Larson et. al., Nat Protoc. 2013 Nov;8(11):2180-96]; [Mali et. at., Nat Methods. 2013 Oct;10(10):957-63];

[Nakayama et. al., Geneis. 2013 Dec;51(12):835-43]; [Ran et. al., Nat Protoc. 2013 Nov;8(11):2281-308]; [Ran et. al., Cell. 2013 Sep 12;154(6):1380-9]; [Upadhyay et. al., G3 (Bethesda). 2013 Dec 9;3(12):2233-8]; [Walsh et. al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Sep 24;110(39):15514-5]; [Xie et. al., Mol Plant. 2013 Oct 9]; [Yang et. al., Cell. 2013 Sep 12;154(6):1370-9]; [Briner et al., Mol Cell. 2014 Oct 23;56(2):333-9]; [Burstein et al., Nature. 2016 Dec 22 - 인쇄 전 온라인 공개 (Epub ahead of print)]; [Gao et al., Nat Biotechnol. 2016 Jul 34(7):768-73]; 뿐 아니라 국제 특허 출원 번호 WO2002099084; WO00/42219; WO02/42459; WO2003062455; WO03/080809; WO05/014791; WO05/084190; WO08/021207; WO09/042186; WO09/054985; 및 WO10/065123; 미국 특허 출원 공개 번호 20030059767, 20030108880, 20140068797; 20140170753; 20140179006; 20140179770; 20140186843; 20140186919; 20140186958; 20140189896; 20140227787; 20140234972; 20140242664; 20140242699; 20140242700; 20140242702; 20140248702; 20140256046; 20140273037; 20140273226; 20140273230; 20140273231; 20140273232; 20140273233; 20140273234; 20140273235; 20140287938; 20140295556; 20140295557; 20140298547; 20140304853; 20140309487; 20140310828; 20140310830; 20140315985; 20140335063; 20140335620; 20140342456; 20140342457; 20140342458; 20140349400; 20140349405; 20140356867; 20140356956; 20140356958; 20140356959; 20140357523; 20140357530; 20140364333; 20140377868; 20150166983 및 20160208243; 및 미국 특허 번호 6,140,466; 6,511,808; 6,453,242 8,685,737; 8,906,616; 8,895,308; 8,889,418; 8,889,356; 8,871,445; 8,865,406; 8,795,965; 8,771,945 및 8,697,359 (이들 문헌은 모두 그 전문이 본원에 참조로서 인용된다).

[0301] *전달*

[0302] 핵산, 단백질 또는 리보핵단백질 페이로드를 세포에 전달하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 세포를 대상 전달 분자와 접촉시키는 단계를 포함한다. 세포는 본 개시의 전달 분자의 표적화 리간드에 의해 표적화된 세포 표면 단백질을 포함하는 임의의 세포일 수 있다. 일부 경우에서, 세포는 포유류 세포 (예를 들어, 설치류 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 돼지 세포, 소 세포, 말 세포, 양 세포, 토끼 세포, 기니어 피그 세포, 개 세포, 고양이 세포, 영장류 세포, 비인간 영장류 세포, 인간 세포 등)이다.

[0303] 이러한 방법은 세포를 대상 전달 분자와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 대상 전달 분자는 페이로드를 임의의 목적하는 진핵생물 표적 세포에 전달하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 표적 세포는 포유류 세포 (예를 들어, 설치류, 마우스, 래트, 유제류(ungulate), 소, 양, 돼지, 말, 낙타, 토끼, 개, 고양이, 영장류, 비인간 영장류 또는 인간의 세포)이다. 임의의 세포 유형이 표적화될 수 있으며, 일부 경우에서, 특정 세포의 특이적 표적화는, 예를 들어 전달 분자의 일부로서, 특정 세포 유형에 대한 표적화 결합을 제공하는 표적화 리간드의 존재에 의존한다. 예를 들어, 표적화될 수 있는 세포에는, 비제한적으로, 하기가 포함된다: 골수 세포, 조혈 줄기 세포 (HSC), 장기 HSC, 단기 HSC, 조혈 줄기 및 전구 세포 (HSPC), 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 골수 전구 세포, 림프구 전구 세포, T-세포, B-세포, NKT 세포, NK 세포, 수지상 세포, 단핵구, 과립구, 적혈구, 거핵구, 비만 세포, 호염기구, 호산구, 호중구, 대식세포, 적혈구 전구 세포 (예를 들어, HUDEP 세포), 거핵구-적혈구 전구 세포 (MEP), 일반 골수 전구 세포 (CMP), 다능성 전구 세포 (MPP), 조혈 줄기 세포 (HSC), 단기 HSC (ST-HSC), IT-HSC, 장기 HSC (LT-HSC), 내피 세포, 뉴런, 성상 세포, 췌장 세포, 췌장 β-섬 세포, 근육 세포, 골격근 세포, 심근 세포, 간 세포, 지방 세포, 장내 세포, 결장의 세포 및 위의 세포.

[0304] (예를 들어, 표적화 뉴런, 췌장의 세포, 조혈 줄기 세포 및 다능성 전구체 등의 표적화를 위한) 다양한 적용 예가 무수히 많다. 예를 들어, 조혈 줄기 세포 및 다능성 전구체는 생체내 유전자 편집 (예를 들어, 삽입)을 위해 표적화될 수 있다. 심지어 생체내 골수 세포의 1% (약 150억개의 세포)를 편집하는 것은 생체외 요법 (약 100억개의 세포)보다 더 많은 세포를 표적화할 수 있다. 또 다른 예로서, 췌장 세포 (예를 들어, β 섬 세포)는, 예를 들어 췌장암의 치료, 당뇨병 등의 치료를 위해 표적화될 수 있다. 또 다른 예로서, 뉴런과 같은 뇌의 체세포는 (예를 들어, 헌팅턴병, 파킨슨병 (예를 들어, LRRK2 돌연변이) 및 ALS (예를 들어, SOD1 돌연변이)과 같은 적응증을 치료하기 위해) 표적화될 수 있다. 일부 경우에서, 이는 직접적인 두개내 주입을 통해 달성될 수 있다.

[0305] 또 다른 예로서, 조혈계의 내피 세포 및 세포 (예를 들어, 거핵구 및/또는 거핵구의 업스트림의 임의의 전구 세포, 예컨대 거핵구-적혈구 전구 세포 (MEP), 일반 골수 전구 세포 (CMP), 다능성 전구 세포 (MPP), 조혈 줄기 세포 (HSC), 단기 HSC (ST-HSC), IT-HSC, 장기 HSC (LT-HSC)는, 본 빌레브란트병(Von Willebrand's disease)을 치료하기 위해 대상 전달 분자로 표적화될 수 있다. 예를 들어, 본 빌레브란트 인자 (VWF)를 인코딩하는 유전자 내 돌연변이를 갖는 세포 (예를 들어, 내피 세포, 거핵구 및/또는 거핵구의 업스트림의 임의의 전구 세포,

예컨대 MEP, CMP, MPP, HSC, 예컨대 ST-HSC, IT-HSC 및/또는 LT-HSC)는, 활성 단백질을 도입하기 위해 (예를 들어, 기능성 VWF 단백질 및/또는 기능성 VWF 단백질을 인코딩하는 핵산의 전달을 통해) 및/또는 예를 들어 대체 서열을 도입함으로써 돌연변이된 유전자를 편집하기 위해 (예를 들어, 유전자 편집 도구의 전달 및 DNA 공여체 템플릿의 전달을 통해), (시험관내, 생체외, 생체내) 표적화될 수 있다. 상기 경우의 일부에서 (예를 들어, 본 빌레브란트병의 치료와 관련된 경우, VWF를 인코딩하는 유전자 내 돌연변이를 갖는 세포의 표적화와 관련된 경우), 대상 표적화 리간드는 E-셀렉틴에 대한 표적화된 결합을 제공한다.

[0306] 또 다른 예로서, 줄기 세포 계통의 세포 (예를 들어, 조혈 계통의 줄기 및/또는 전구 세포, 예를 들어 GMP, MEP, CMP, MLP, MPP 및/또는 HSC)는, 세포 내 줄기 세포 인자 (SCF)의 발현을 증가시켜 표적화된 세포를 증식시킬 수 있는 대상 전달 분자 (또는 대상 바이러스 또는 비(非)바이러스성 전달 비히클)로 표적화될 수 있다. 예를 들어, 대상 전달 분자는 SCF 및/또는 SCF를 인코딩하는 핵산 (DNA 또는 mRNA)을 표적화된 세포에 전달하는데 사용될 수 있다.

[0307] 본 개시의 방법 및 조성물은, 공지된 원인이 되는 돌연변이, 예를 들어 게놈 내 돌연변이에 관련된 임의의 질환을 포함하는, 다수의 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 방법 및 조성물은 겸상 적혈구 질환, β 지중해 빈혈, HIV, 골수이형성 증후군, JAK2-매개 진성 적혈구증가증, JAK2-매개 원발성 골수섬유증, JAK2-매개 백혈병 및 다양한 혈액학적 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 추가의 비제한적인 예로서, 본 개시의 방법 및 조성물은 또한 B-세포 항체 생성, 면역요법 (예를 들어, 체크포인트 차단 시약의 전달) 및 줄기 세포 분화 적용에 사용될 수 있다.

[0308] 상기 언급된 바와 같이, 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 KLS CD27+/IL-7Ra-/CD150+/CD34- 조혈 줄기 및 전구 세포 (HSPC)에 대한 표적화된 결합을 제공한다. 예를 들어, 유전자 편집 도구(들) (본원의 다른 곳에 기재됨)은 BCL11a 전사 인자의 발현을 방해하여, 결과적으로 태아 헤모글로빈을 생성하기 위해 도입될 수 있다. 또 다른 예로서, 베타-글로빈 (HBB) 유전자는 상응하는 상동성 지향(homology-directed) 복구 공여체 템플릿으로 변경된 E7V 치환을 정정하기 위해 직접 표적화될 수 있다. 하나의 예시적인 예로서, CRISPR/Cas RNA-가이드된 폴리펩티드 (예를 들어, Cas9, CasX, CasY, Cpf1)는, 이것이 HBB 유전자 내 좌위에 결합하여 게놈에서 이중 가닥 또는 단일 가닥을 절단하여 게놈 복구를 개시하도록, 적절한 가이드 RNA와 함께 전달된다. 일부 경우에서, DNA 공여체 템플릿 (단일 가닥 또는 이중 가닥)이 (페이로드의 일부로서) 도입된다. 일부 경우에서, 페이로드는, 예를 들어 상동성 지향 복구 (HDR)를 촉진하고, 인델(indel) 형성을 제한하기 위해 사용될 수 있는, ku70 또는 ku80에 대한 siRNA를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, SIRT6에 대한 mRNA는 뉴클레아제-매개 부위-특이적 절단 후 공여체 가닥의 HDR-유래 삽입을 촉진하기 위해, 14-30d 상에 방출된다.

[0309] 일부 구현예에서, 표적화 리간드는 T-세포 수용체를 변형시키기 위해, CD4+ 또는 CD8+ T-세포, 조혈 줄기 및 전구 세포 (HSPC), 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에 대한 표적화된 결합을 제공한다. 예를 들어, 유전자 편집 도구(들) (본원이 다른 곳에 기재됨)은 T-세포 수용체를 변형시키기 위해 도입될 수 있다. T-세포 수용체는 직접 표적화되고, 신규한 T-세포 수용체에 대한 상응하는 상동성 지향 복구 공여체 템플릿으로 치환될 수 있다. 하나의 예로서, CRISPR/Cas RNA-가이드된 폴리펩티드 (예를 들어, Cas9, CasX, CasY, Cpf1)는, 이것이 TCR 유전자 내 좌위에 결합하여 게놈에서 이중 가닥 또는 단일 가닥을 절단하여 게놈 복구를 개시하도록, 적절한 가이드 RNA와 함께 전달될 수 있다. 일부 경우에서, DNA 공여체 템플릿 (단일 가닥 또는 이중 가닥)이 HDR을 위해 (페이로드의 일부로서) 도입된다. 다른 CRISPR 가이드 RNA 및 HDR 공여체 서열, 표적화 베타-글로빈, CCR5, T-세포 수용체, 또는 임의의 다른 관심 유전자, 및/또는 다른 발현 벡터가 본 개시에 따라 이용될 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다.

[0310] 일부 경우에서, 접촉은 시험관내이며 (예를 들어, 세포는 배양 중임), 예를 들어 세포는 확립된 조직 배양 세포주의 세포일 수 있다. 일부 경우에서, 접촉은 생체외이다 (예를 들어, 세포는 개체, 예를 들어 환자로부터 단리된 1차 세포 (또는 최근의 자손)임). 일부 경우에서, 세포는 생체내이며, 따라서 유기체의 내부 (이의 일부)이다. 생체내 접촉의 예로서, 일부 경우에서, 접촉 단계는, 전달 분자 (예를 들어, 핵산 또는 단백질 페이로드에 컨쥬게이션된 표적화 리간드, 대상 표적화 리간드로 코팅된 나노입자, 핵산 페이로드와 응축된 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션된 표적화 리간드 등)의 개체에의 투여를 포함한다.

[0311] 대상 전달 분자는 하기 경로 중 임의의 것을 통해 대상에 도입 (즉, 개체에 투여)될 수 있다: 전신, 국소, 비경구, 피하 (s.c.), 정맥내 (i.v.), 두개내 (i.c.), 척수내, 안구내, 피내 (i.d.), 근육내 (i.m.), 림프관내 (i.l.) 또는 척수액내. 대상 전달 분자는 주사 (예를 들어, 전신 주사, 직접 국소 주사, 종양 및/또는 종양 절제 부위 내로 또는 근처에의 국소 주사 등), 카테터 등에 의해 도입될 수 있다. 국소 전달 (예를 들어, 종양

및/또는 암 부위로의 전달) 방법의 예에는, 예를 들어 관절, 종양 또는 기관 내로 또는 관절, 종양 또는 기관 근처에의, 예를 들어 시린지로의, 예를 들어 볼루스 주사; 예를 들어 대류를 이용하여, 예를 들어 관삽입에 의한, 예를 들어 연속 주입이 포함된다 (예를 들어 미국 특허 출원 제20070254842호 참조, 상기 문헌은 본원에 참조로서 인용됨).

[0312] 대상에 대한 치료의 투여 횟수는 가변적일 수 있다. 대상 전달 분자를 개체에 도입하는 것은 1회성 사건일 수 있으나; 특정 상황에서, 이러한 치료는 제한된 기간 동안 개선을 이끌어 내고, 지속적인 일련의 반복 치료가 요구될 수 있다. 다른 상황에서, 효과가 관찰되기 전, 대상 전달 분자의 다중 투여가 요구될 수 있다. 당업자가 쉽게 이해할 수 있는 바와 같이, 정확한 프로토콜은 질환 또는 병태, 질환의 단계 및 치료하고자 하는 개체의 매개변수에 따라 달라진다.

[0313] "치료적 유효 용량" 또는 "치료 용량"은 목적하는 임상 결과를 달성하기에 (즉, 치료적 효능을 달성하기에) 충분한 양이다. 치료적 유효 용량은 1회 이상 투여로 투여될 수 있다. 본 개시의 목적을 위하여, 대상 전달 분자의 치료적 유효 용량은, 개체에게 투여되는 경우, 질환 상태/질병의 진행을 완화, 경감, 안정화, 역전, 예방, 둔화 또는 지연시키는데 충분한 양이다.

[0314] 예시적인 치료적 개입은 숙주 게놈에 통합된 임의의 레트로바이러스 DNA를 절제하는 것 이외에, HIV 감염에 대한 내성을 생성시키는 것이다. T-세포는 HIV에 의해 직접적으로 영향을 받기 때문에, CD34+ 및 CD45+ 세포에 대한 하이브리드 혈액 표적화 전략이 이중 유도된 뉴클레아제의 전달을 위해 조사될 수 있다. HSC 및 T-세포를 동시에 표적화하고, (예를 들어, 단일 입자 내) 다중 유도 뉴클레아제를 통해 CCR5-Δ32 및 gag/rev/pol 유전자에 절제(ablation)를 전달함으로써, 보편적인 HIV 치료가 환자의 일생을 통해 지속적으로 생성될 수 있다.

[0315] 대상 전달 분자는 다양한 목적을 위해 매우 다양한 다른 올리고펩티드 또는 단백질로 변형, 예를 들어 이에 연결될 수 있다. 예를 들어 프레닐화, 아세틸화, 아미드화, 카르복실화, 글리코실화, PEG화 (폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 중합체 사슬의 공유 결합적 부착) 등에 의해, 예를 들어 번역 후 변형될 수 있다. 이러한 변형은 또한 글리코실화의 변형, 예를 들어 이의 합성 및 처리 동안 또는 추가의 처리 단계에서 폴리펩티드의 글리코실화 패턴을 변형시킴으로써; 예를 들어 전달 분자를 글리코실화에 영향을 미치는 효소, 예컨대 포유류 글리코실화 또는 탈글리코실화 효소에 노출시킴으로써 만들어진 것들을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상 전달 분자는 하나 이상의 인산화 아미노산 잔기, 예를 들어 포스포티로신, 포스포세린 또는 포스포트레오닌을 갖는다.

[0316] 일부 다른 구현예에서, 본 개시의 전달 분자는 단백질 분해에 대한 내성을 개선시키거나, 용해도 특성을 최적화하거나 또는 이를 치료제로서 보다 적합하게 하기 위해 변형될 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 전달 분자는 천연 발생 L-아미노산 이외의 잔기, 예를 들어 D-아미노산 또는 비(非)천연 발생 합성 아미노산을 함유하는 유사체를 포함할 수 있다. D-아미노산은 아미노산 잔기의 일부 또는 전부로 치환될 수 있다.

[0317] 일부 경우에서, 대상 전달 분자는 바이오센싱 적용을 위해, 예를 들어 항체 대신, 표면 상에 (예를 들어, 디쉬/플레이트 형식으로) 포매될 수 있다. 일부 경우에서, 대상 전달 분자는 나노다이아몬드에 첨가될 수 있다 (예를 들어, 나노다이아몬드를 코팅하는데 사용될 수 있다).

[0318] 또한 키트가 본 개시의 범위 내에 포함된다. 예를 들어, 일부 경우에서, 대상 키트는 하기 중 하나 이상을 (임의의 조합으로) 포함할 수 있다: (i) 표적화 리간드, (ii) 링커, (iii) 링커에 컨쥬게이션된 표적화 리간드, (iv) (예를 들어, 링커 유무 하에서) 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션된 표적화 리간드, (v) siRNA, 또는 siRNA 또는 shRNA에 대한 전사 템플릿; 및 (iv) 음이온성 나노입자 안정화 코트로서 사용하기 위한 작용제. 일부 경우에서, 대상 키트는 사용 지침을 포함할 수 있다. 키트에는 전형적으로 키트의 내용물의 의도된 용도를 나타내는 라벨이 포함되어 있다. 용어 라벨은, 키트 상에 또는 키트와 일체로 제공된, 또는 다르게는 키트와 함께 제공되는 임의의 서면 또는 기록된 자료를 포함한다.

[0319] **본 개시의 예시적인 비제한적인 양태**

[0320] 상기 기재된 본 발명의 주제의 양태 (구현예 포함)는, 단독으로, 또는 하나 이상의 다른 양태 또는 구현예와 조합으로 유익할 수 있다. 전술한 설명을 제한하지 않으면서, 1-50 (세트 A) 및 1-59 (세트 B)로 번호 매겨진 개시의 특정 비제한적인 양태가 이하에 제시된다. 본 개시를 읽는 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 개별적으로 번호 매겨진 양태는 각각, 임의의 선행하는 또는 후속하는 개별적으로 번호 매겨진 양태와 함께 사용되거나 조합될 수 있다. 이는 이러한 양태의 모든 조합에 대한 뒷받침을 제공하기 위한 것으로 의도되며, 하기 명시적으로 제공되는 양태의 조합에 제한되지 않는다:

[0321] **세트 A**

[0322] 1. 단백질 또는 핵산 페이로드에 컨쥬게이션된, 또는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션된 펩티드 표적화 리간드를 포함하는 전달 분자로서, 여기서 표적화 리간드가 (i) 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합, 및 (ii) 긴 엔도좀 재순환 경로의 개입을 제공하는 전달 분자.

[0323] 2. 제1에 있어서, 표적화 리간드가 내부 시스테인 잔기를 포함하는 전달 분자.

[0324] 3. 제1 또는 제2에 있어서, 표적화 리간드가 상응하는 야생형 아미노산 서열에 대하여, 하나 이상의 내부 아미노산 위치에서, 시스테인 치환 또는 삽입을 포함하는 전달 분자.

[0325] 4. 제1 내지 제3 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 N- 및/또는 C-말단에 시스테인 잔기를 포함하는 전달 분자.

[0326] 5. 제4에 있어서, N- 및/또는 C-말단의 시스테인 잔기가 상응하는 야생형 아미노산 서열에 대한 치환 또는 삽입인 전달 분자.

[0327] 6. 제1 내지 제6 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 5-50개의 아미노산 길이를 갖는 전달 분자.

[0328] 7. 제1 내지 제6 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 야생형 단백질의 단편인 전달 분자.

[0329] 8. 제1 내지 제7 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 패밀리 B G-단백질 연결 수용체 (GPCR), 수용체 티로신 키나아제 (RTK), 세포 표면 당단백질 및 세포-세포 부착 분자로부터 선택되는 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합을 제공하는 전달 분자.

[0330] 9. 제8에 있어서, 표적화 리간드가 표적화된 결합 및 긴 엔도좀 재순환 경로의 개입을 각각 제공하기 위해, 패밀리 B GPCR의 알로스테릭-친화성 도메인 및 오르토스테릭 도메인 둘 모두에 대한 결합을 제공하는 전달 분자.

[0331] 10. 제9에 있어서, 표적화 리간드가 엑센딘-4 아미노산 서열: HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 번호 1)과 85% 이상의 동일성 (예를 들어 100%의 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 전달 분자.

[0332] 11. 제10에 있어서, 표적화 리간드가 (서열 번호 1)에 기재된 아미노산 서열의 L10, S11 및 K12에 상응하는 하나 이상의 위치에서 시스테인 치환을 포함하는 전달 분자.

[0333] 12. 제9에 있어서, 표적화 리간드가 아미노산 서열: HGEGTFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 번호 2)를 포함하는 전달 분자.

[0334] 13. 제8에 있어서, 표적화 리간드가 RTK에 대한 표적화된 결합을 제공하는 전달 분자.

[0335] 14. 제13에 있어서, RTK가 섬유아세포 성장 인자 (FGF) 수용체인 전달 분자.

[0336] 15. 제14에 있어서, 표적화 리간드가 FGF의 단편인 전달 분자.

[0337] 16. 제14 또는 제15에 있어서, 표적화 리간드가 오르토스테릭 결합 동안 점유된 RTK의 분절에 결합하는 전달 분자.

[0338] 17. 제13 내지 제16 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 RTK의 헤파린-친화성 도메인에 결합하는 전달 분자.

[0339] 18. 제13 내지 제17 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 FGF 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공하고, 여기서 표적화 리간드는 아미노산 서열 KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (서열 번호 4)와 85% 이상의 동일성 (예를 들어 100%의 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 전달 분자.

[0340] 19. 제13 내지 제17 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 FGF 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공하고, 여기서 표적화 리간드는 아미노산 서열 HFKDPK (서열 번호 5)를 포함하는 전달 분자.

[0341] 20. 제13 내지 제17 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 FGF 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공하고, 여기서 표적화 리간드는 아미노산 서열 LESNNYNT (서열 번호 6)을 포함하는 전달 분자.

[0342] 21. 제8에 있어서, 표적화 리간드가 세포 표면 당단백질 및/또는 세포-세포 부착 인자에 대한 표적화된 결합을 제공하는 전달 분자.

[0343] 22. 제21에 있어서, 표적화 리간드가 E-셀렉틴, L-셀렉틴 또는 P-셀렉틴의 단편인 전달 분자.

[0344] 23. 제21에 있어서, 표적화 리간드가 아미노산 서열 MIASQFLSALTLVLLIKESGA (서열 번호 7)과 85% 이상의 동일성 (예를 들어 100%의 동일성)을 갖는 아미노산 서열인 전달 분자.

[0345] 24. 제21에 있어서, 표적화 리간드가 아미노산 서열 MVFPWRCEGTYWGSRNILKLWVWTLLCCDFLIHHGTHC (서열 번호 8), MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCCDFLAHHGTDC (서열 번호 9) 및/또는 MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCC (서열 번호 10)과 85% 이상의 동일성 (예를 들어 100%의 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 전달 분자.

[0346] 25. 제8에 있어서, 표적화 리간드가 세포-대-세포 부착 분자에 대한 표적화된 결합을 제공하는 전달 분자.

[0347] 26. 제1 내지 제7 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 트랜스페린 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공하고, 여기서 표적화 리간드는 아미노산 서열 THRPPMWSPVWP (서열 번호 11)과 85% 이상의 동일성 (예를 들어 100%의 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 전달 분자.

[0348] 27. 제1 내지 제7 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 α5β1 인테그린에 대한 표적화된 결합을 제공하는 전달 분자.

[0349] 28. 제27에 있어서, 표적화 리간드가 아미노산 서열 RRETAWA (서열 번호 12)를 포함하는 전달 분자.

[0350] 29. 제27에 있어서, 표적화 리간드가 아미노산 서열 RGD를 포함하는 전달 분자.

[0351] 30. 제1 내지 제29 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 (예를 들어, 신호전달 편향을 제공하고, 오르토스테릭 결합 후 세포내이입을 통해 내재화를 촉진시키기 위해) 세포 표면 단백질에의 결합 시 β-아레스틴의 개입을 제공하는 전달 분자.

[0352] 31. 제1 내지 제30 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 핵산 페이로드에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0353] 32. 제31에 있어서, 핵산 페이로드가 RNAi 작용제인 전달 분자.

[0354] 33. 제32에 있어서, RNAi 작용제가 siRNA 분자인 전달 분자.

[0355] 34. 제1 내지 제30 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 단백질 페이로드에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0356] 35. 제1 내지 제30 중 어느 하나에 있어서, 페이로드가 리보핵단백질 복합체이고, 표적화 리간드가 상기 복합체의 핵산 또는 단백질 구성요소에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0357] 36. 제1 내지 제30 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0358] 37. 제36에 있어서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인이 핵산 페이로드와 응축되어 있는 전달 분자.

[0359] 38. 제36에 있어서, 전달 분자의 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인이 나노입자의 하전된 안정화 층과 정전기적으로 상호작용하는 전달 분자.

[0360] 39. 제36 내지 제38 중 어느 하나에 있어서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인이 RRRRRRRRR (9R) (서열 번호 15) 및 HHHHHH (6H) (서열 번호 16)으로부터 선택된 양이온성 도메인인 전달 분자.

[0361] 40. 제1 내지 제39 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 시스테인 잔기를 포함하고, 시스테인 잔기를 통해 페이로드에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0362] 41. 제1 내지 제40 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 술프히드릴 또는 아민-반응성 화학을 통해 페이로드에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0363] 42. 제1 내지 제41 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 개재 링커를 통해 페이로드에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0364] 43. 제42에 있어서, 표적화 리간드가 시스테인 잔기를 포함하고, 시스테인 잔기를 통해 링커에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0365] 44. 제 42 또는 제43에 있어서, 링커가 술프히드릴 또는 아민-반응성 화학을 통해 표적화 리간드 및/또는 페이로드에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0366] 45. 제42 내지 제44 중 어느 하나에 있어서, 링커가 강성인 전달 분자.

[0367] 46. 제42 내지 제44 중 어느 하나에 있어서, 링커가 가요성인 전달 분자.

[0368] 47. 제42 내지 제44 중 어느 하나에 있어서, 링커가 엔도좀분해성인 전달 분자.

[0369] 48. 제42 내지 제47 중 어느 하나에 있어서, 링커가 폴리펩티드인 전달 분자.

[0370] 49. 제42 내지 제47 중 어느 하나에 있어서, 링커가 폴리펩티드가 아닌 전달 분자.

[0371] 50. 핵산, 단백질 또는 리보핵단백질 페이로드를 세포에 전달하는 방법으로서, 세포를 제1 내지 제49 중 어느 하나의 전달 분자와 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

[0372] 51. 제50에 있어서, 세포가 포유류 세포인 방법.

[0373] 52. 제50 또는 제51에 있어서, 세포가 시험관내 또는 생체외에 존재하는 것인 방법.

[0374] 53. 제50 또는 제51에 있어서, 세포가 생체내에 존재하는 것인 방법.

[0375] **세트 B**

[0376] 1. 단백질 또는 핵산 페이로드에 컨쥬게이션된, 또는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션된 펩티드 표적화 리간드를 포함하는 전달 분자로서, 여기서 표적화 리간드가 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합을 제공하는 전달 분자.

[0377] 2. 제1에 있어서, 표적화 리간드가 내부 시스테인 잔기를 포함하는 전달 분자.

[0378] 3. 제1 또는 제2에 있어서, 표적화 리간드가 상응하는 야생형 아미노산 서열에 대하여, 하나 이상의 내부 아미노산 위치에서, 시스테인 치환 또는 삽입을 포함하는 전달 분자.

[0379] 4. 제1 내지 제3 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 N- 및/또는 C-말단에 시스테인 잔기를 포함하는 전달 분자.

[0380] 5. 제4에 있어서, N- 및/또는 C-말단의 시스테인 잔기가 상응하는 야생형 아미노산 서열에 대한 치환 또는 삽입인 전달 분자.

[0381] 6. 제1 내지 제5 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 5-50개의 아미노산 길이를 갖는 전달 분자.

[0382] 7. 제1 내지 제6 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 야생형 단백질의 단편인 전달 분자.

[0383] 8. 제1 내지 제7 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 패밀리 B G-단백질 연결 수용체 (GPCR), 수용체 티로신 키나아제 (RTK), 세포 표면 당단백질 및 세포-세포 부착 분자로부터 선택되는 세포 표면 단백질에 대한 표적화된 결합을 제공하는 전달 분자.

[0384] 9. 제8에 있어서, 표적화 리간드가 표적화된 결합 및 긴 엔도좀 재순환 경로의 개입을 각각 제공하기 위해, 패밀리 B GPCR의 알로스테릭-친화성 도메인 및 오르토스테릭 도메인 둘 모두에 대한 결합을 제공하는 전달 분자.

[0385] 10. 제9에 있어서, 표적화 리간드가 엑센딘-4 아미노산 서열: HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 번호 1)과 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 전달 분자.

[0386] 11. 제10에 있어서, 표적화 리간드가 (서열 번호 1)에 기재된 아미노산 서열의 L10, S11 및 K12에 상응하는 하나 이상의 위치에서 시스테인 치환을 포함하는 전달 분자.

[0387] 12. 제9에 있어서, 표적화 리간드가 아미노산 서열: HGEGTFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 번호 2)를 포함하는 전달 분자.

[0388] 13. 제8에 있어서, 표적화 리간드가 RTK에 대한 표적화된 결합을 제공하는 전달 분자.

[0389] 14. 제13에 있어서, RTK가 섬유아세포 성장 인자 (FGF) 수용체인 전달 분자.

[0390] 15. 제14에 있어서, 표적화 리간드가 FGF의 단편인 전달 분자.

[0391] 16. 제14 또는 제15에 있어서, 표적화 리간드가 오르토스테릭 결합 동안 점유된 RTK의 분절에 결합하는 전달 분자.

[0392] 17. 제13 내지 제16 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 RTK의 헤파린-친화성 도메인에 결합하는 전달 분자.

[0393] 18. 제13 내지 제17 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 FGF 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공하고, 여기서 표적화 리간드는 아미노산 서열 KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (서열 번호 4)와 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 전달 분자.

[0394] 19. 제13 내지 제17 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 FGF 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공하고, 여기서 표적화 리간드는 아미노산 서열 HFKDPK (서열 번호 5)를 포함하는 전달 분자.

[0395] 20. 제13 내지 제17 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 FGF 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공하고, 여기서 표적화 리간드는 아미노산 서열 LESNNYNT (서열 번호 6)을 포함하는 전달 분자.

[0396] 21. 제8에 있어서, 표적화 리간드가 세포 표면 당단백질 및/또는 세포-세포 부착 인자에 대한 표적화된 결합을 제공하는 전달 분자.

[0397] 22. 제21에 있어서, 표적화 리간드가 E-셀렉틴, L-셀렉틴 또는 P-셀렉틴의 단편인 전달 분자.

[0398] 23. 제21에 있어서, 표적화 리간드가 아미노산 서열 MIASQFLSALTLVLLIKESGA (서열 번호 7)과 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 전달 분자.

[0399] 24. 제21에 있어서, 표적화 리간드가 아미노산 서열 MVFPWRCEGTYWGSRNILKLWVWTLLCCDFLIHHGTHC (서열 번호 8), MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCCDFLAHHGTDC (서열 번호 9) 및/또는 MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCC (서열 번호 10)과 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 전달 분자.

[0400] 25. 제8에 있어서, 표적화 리간드가 세포-대-세포 부착 분자에 대한 표적화된 결합을 제공하는 전달 분자.

[0401] 26. 제1 내지 제7 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 트랜스페린 수용체에 대한 표적화된 결합을 제공하고, 여기서 표적화 리간드는 아미노산 서열 THRPPMWSPVWP (서열 번호 11)과 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 전달 분자.

[0402] 27. 제1 내지 제7 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 α5β1 인테그린에 대한 표적화된 결합을 제공하는 전달 분자.

[0403] 28. 제27에 있어서, 표적화 리간드가 아미노산 서열 RRETAWA (서열 번호 12)를 포함하는 전달 분자.

[0404] 29. 제27에 있어서, 표적화 리간드가 아미노산 서열 RGD를 포함하는 전달 분자.

[0405] 30. 제1 내지 제29 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 세포 표면 단백질에의 결합 시 β-아레스틴의 개입을 제공하는 전달 분자.

[0406] 31. 제1 내지 제30 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 핵산 페이로드에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0407] 32. 제31에 있어서, 핵산 페이로드가 RNAi 작용제인 전달 분자.

[0408] 33. 제32에 있어서, RNAi 작용제가 siRNA 분자인 전달 분자.

[0409] 34. 제1 내지 제30 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 단백질 페이로드에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0410] 35. 제1 내지 제30 중 어느 하나에 있어서, 페이로드가 리보핵단백질 복합체이고, 표적화 리간드가 상기 복합체의 핵산 또는 단백질 구성요소에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0411] 36. 제1 내지 제30 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0412] 37. 제36에 있어서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인이 핵산 페이로드와 응축되어 있는 전달 분자.

[0413] 38. 제36항 또는 제37에 있어서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인이 단백질 페이로드와 정전기적으로 상호작용하는 전달 분자.

[0414] 39. 제36 내지 제38 중 어느 하나에 있어서, 음이온성 중합체를 포함하는 조성물에 존재하는 전달 분자.

[0415] 40. 제39에 있어서, 상기 조성물이 폴리(글루탐산) 및 폴리(아스파르트산)으로부터 선택되는 적어도 하나의 음이온성 중합체를 포함하는 전달 분자.

[0416] 41. 제36에 있어서, 전달 분자의 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인이 나노입자의 하전된 안정화 층과 정전기적

으로 상호작용하는 전달 분자.

[0417] 42. 제36 내지 제41 중 어느 하나에 있어서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인이 RRRRRRRRR (9R) (서열 번호 15) 및 HHHHHH (6H) (서열 번호 16)으로부터 선택된 양이온성 도메인인 전달 분자.

[0418] 43. 제36 내지 제42 중 어느 하나에 있어서, 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인이 히스톤 테일 펩티드 (HTP)를 포함하는 전달 분자.

[0419] 44. 제1 내지 제43 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 시스테인 잔기를 포함하고, 상기 시스테인 잔기를 통해 페이로드에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0420] 45. 제1 내지 제44 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 술프히드릴 또는 아민-반응성 화학을 통해 페이로드에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0421] 46. 제1 내지 제45 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 개재 링커를 통해 페이로드에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0422] 47. 제46에 있어서, 표적화 리간드가 시스테인 잔기를 포함하고, 상기 시스테인 잔기를 통해 링커에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0423] 48. 제46 또는 제47에 있어서, 링커가 술프히드릴 또는 아민-반응성 화학을 통해 표적화 리간드 및/또는 페이로드에 컨쥬게이션되어 있는 전달 분자.

[0424] 49. 제46 내지 제48 중 어느 하나에 있어서, 링커가 강성인 전달 분자.

[0425] 50. 제46 내지 제48 중 어느 하나에 있어서, 링커가 가요성인 전달 분자.

[0426] 51. 제46 내지 제48 중 어느 하나에 있어서, 링커가 엔도좀분해성인 전달 분자.

[0427] 52. 제46 내지 제51 중 어느 하나에 있어서, 링커가 폴리펩티드인 전달 분자.

[0428] 53. 제46 내지 제51 중 어느 하나에 있어서, 링커가 폴리펩티드가 아닌 전달 분자.

[0429] 54. 제1 내지 제53 중 어느 하나에 있어서, 표적화 리간드가 긴 엔도좀 재순환 경로의 개입을 제공하는 전달 분자.

[0430] 55. 핵산, 단백질 또는 리보핵단백질 페이로드를 세포에 전달하는 방법으로서, 세포를 제1 내지 제54 중 어느 하나의 전달 분자와 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

[0431] 56. 제55에 있어서, 세포가 포유류 세포인 방법.

[0432] 57. 제55 또는 제56에 있어서, 세포가 시험관내 또는 생체외에 존재하는 것인 방법.

[0433] 58. 제55 또는 제56에 있어서, 세포가 생체내에 존재하는 것인 방법.

[0434] 59. 제55 내지 제58 중 어느 하나에 있어서, 세포가 T 세포, 조혈 줄기 세포 (HSC), 골수 세포 및 혈액 세포로부터 선택되는 세포인 방법.

[0435] 본 발명의 의미 또는 범위를 벗어나지 않는 한 다양한 변화 및 변형이 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다.

[0436] **실험부**

[0437] 하기 실시예는 본 발명을 제조하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 당업자에게 제공하기 위해 제시되며, 이는 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것도, 하기 실험이 전부 또는 수행된 유일한 실험이라는 것을 나타내는 것도 아니다. 사용된 숫자 (예를 들어, 양, 온도 등)에 대한 정확성을 보장하기 위한 노력이 이루어졌지만, 일부 실험 오차 및 편차는 고려되어야 한다. 달리 지시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량평균 분자량이며, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압 또는 대기압 부근이다.

[0438] 본 명세서에 인용된 모든 출판물 및 특허 출원은, 각각의 개별적인 출판물 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조로서 인용되는 것으로 지시된 바와 같이, 본원에 참조로서 인용된다.

[0439] 본 발명은 본 발명의 실시를 위한 바람직한 방식을 포함하도록 발견 또는 제안된 특정 실시예의 측면에서 기재되었다. 당업자는, 본 개시에 비추어, 본 발명의 의도된 범위를 벗어나지 않는 한 예시된 특정 구현예 내에서

다수의 변형 및 변화가 이루어질 수 있다고 이해할 것이다. 예를 들어, 코돈 중복 (codon redundancy)으로 인해, 단백질 서열에 영향을 미치지 않으면서 근본적인 DNA 서열에 있어서 변화가 이루어질 수 있다. 나아가, 생물학적 기능적 동등성 고려 사항으로 인해, 종류 또는 양에 있어서 생물학적 작용에 영향을 미치지 않으면서 단백질 구조에 있어서 변화가 이루어질 수 있다. 모든 이러한 변형은 첨부된 청구범위에 포함되는 것으로 의도된다.

[0440] 실시예 1: 패밀리 B GPCR에 대한 표적화된 결합을 제공하는 표적화 리간드

[0441] **도 3**은, 예를 들어 알로스테릭/친화성 N-말단 도메인 및 오르토스테릭 엔도좀 분류/신호전달 도메인에 대한 결합을 위한, 표적화 리간드를 평가하는 경우 고려해야 할 개별 도메인을 강조하는, 패밀리 B GPCR의 개략도를 제공한다 (도면은 [Siu, Fai Yiu, et al., Nature 499.7459 (2013): 444-449]에서 취함). 이러한 도메인은 시스테인 치환에 대한 표적화 리간드 엑센딘-4 내에서 부위를 선택하는 경우 고려되었다.

[0442] **도 4**에서, 시스테인 11 치환 (S11C)은, 친화성을 유지하면서, 핵산 방출을 촉진시키고 핵산 분해를 제한하는 긴 엔도좀 재순환 경로에 또한 개입하는 방식으로, 엑센딘-4를 siRNA, 단백질, 또는 하전된 중합체 폴리펩티드 도메인에 컨쥬게이션하기 위한 하나의 가능한 아미노산 변형으로서 확인되었다. 글루카곤-GCGR (4ERS) 및 GLP1-GLP1R-ECD 복합체 (PDB: 3IOL)의 공지된 결정 구조에 대하여 시뮬레이션된 엑센딘-4 (서열 번호 1)의 정렬에 따라, 가교결합된 복합체가 2개의 결합 틈에 지장을 주지 않도록 마주보고 있어야 하는 방향을 예측하기 위해, PDB 렌더링을 3-차원 공간에서 회전시켰다. 세크레틴-패밀리의 리간드의 가교결합 부위가 상응하는 세크레틴-패밀리 수용체의 2개의 결합 틈에 대하여 충분히 직교하는 경우, 고친화성 결합이 일어날 뿐 아니라, 최적의 페이로드 방출을 위한 긴 엔도좀 재순환 경로 격리를 수반할 수 있다고 결정되었다. 이러한 기술을 사용함으로써, 엑센딘-4의 아미노산 위치 10, 11 및 12가 시스테인 잔기의 삽입 또는 시스테인 잔기로의 치환을 위한 위치로서 동정되었다.

[0443] 실시예 2: RTK에 대한 표적화된 결합을 제공하는 표적화 리간드

[0444] 도 5는, 3원 FGF2-FGFR1-헤파린 복합체의 일부로서의 tbFGF 단편 (PDB 상의 1fq9)을 나타낸다. CKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (강조 표시됨) (서열 번호 14)는 FGFR1에 대한 친화성을 위해 중요한 것으로 결정되었다. 도 6은, HFKDPK (서열 번호 5)가 리간드-수용체 오르토스테릭 활성 및 친화성을 위해 사용되는 펩티드로서 결정되었다는 것을 보여준다. 도 7은, LESNNYNT (서열 번호 6)이 리간드-수용체 오르토스테릭 활성 및 친화성을 위해 사용되는 펩티드로서 결정되었다는 것을 보여준다.

[0445] 실시예 3

[0446] 표 2 내지 표 4는, 하기 실험에서 사용된 구성요소에 대한 가이드를 제공한다 (예를 들어, 응축 데이터; 물리화학적 데이터; 및 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터).

표 2

표 2. 하기 실험에 사용된 전달 분자의 특징. 표적화 리간드 명칭/명명법 형식: A_B_C_D_E_F, 여기서 A=수용체 명칭: 수용체 리간드의 명칭이 목표임; B=표적화 리간드 공급원: 수용체를 표적화하는 리간드의 명칭 (리간드가 야생형이 아닌 경우, 변형된 것에 대한 접두어 "m" 또는 "rm"); C = 링커 명칭; D = 하전된 폴리펩티드 명칭; E = B 를 기반으로 하는 링커 말단; 및 F = 버전 번호 (동일한 WT 에서 유래한 것이지만, AA 서열이 상이한 2 개의 변형된 표적화 리간드를 구분하기 위해);

표적화 리간드 (TL) / 펩티드 카달로그 명칭	서열	서열 번호	앵커 충전	앵커 단위 (mer) / 총 단위(mer)	링커 단위 / 총 단위	리간드 단위 / 총 단위
PLR10	RRRRRRRRRR	147	10	100.00%	0.00%	0.00%
CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	SNRWLDVKGGGGGSGGGGSRRRRRRRRR	148	9	32.14%	35.71%	32.14%
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGGSGGGGSVVLKYEKDAFKR	149	9	26.47%	29.41%	44.12%
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	VVLKYEKDAFKRGGGGGSGGGGSRRRRRRRRR	150	9	26.47%	29.41%	44.12%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSENLVLNE	151	9	34.62%	38.46%	26.92%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	ENLVLNEGGGGSGGGGSRRRRRRRRR	152	9	34.62%	38.46%	26.92%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSPTGMIRIHQM	153	9	31.03%	34.48%	34.48%
CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGGSGGGGSAAQEE	154	9	36.00%	40.00%	24.00%
CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSTSVGKYPNTGYYGD	155	9	27.27%	30.30%	42.42%
CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TSVGKYPNTGYYGDGGGGSGGGGSRRRRRRRRR	156	9	27.27%	30.30%	42.42%
IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSNPKLTRMLTFKFY	157	9	28.13%	31.25%	40.63%
IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	NPKLTRMLTFKFYGGGGSGGGGSRRRRRRRRR	158	9	28.13%	31.25%	40.63%
PLK10_PEG22	KKKKKKKKKK-PEG22	159	10	31.25%	68.75%	0.00%
ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR	N/A		9	30.25%	33.61%	36.13%
ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSMIASQFLSALTLVLLIKESGA	160	9	22.50%	25.00%	52.50%
ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_C	MIASQFLSALTLVLLIKESGAGGGGSGGGGSRRRRRRRRR	161	9	22.50%	25.00%	52.50%
cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSEKFILKVRPAFKAV	162	10	31.25%	68.75%	0.00%
EPOR_mEPO_6R_N	RRRRRRTYSCHFG	163	6	25.00%	0.00%	

[0447]

표적화 리간드 (TL) / 펩티드 카달로그 명칭	서열	서열 번호	앵커 충전	앵커 단위 (mer) / 총 단위(mer)	링커 단위 / 총 단위	리간드 단위 / 총 단위
	PLTWVCKPQGG					
EPOR_mEPO_6R_C	TYSCHFGPLTWVC KPQGGRRRRRR	164	6	25.00%	0.00%	
TfR_TfTP_6R_N	RRRRRRTHRPPM WSPVWP	165	6	33.33%	0.00%	
TfR_TfTP_6R_C	THRPPMWSPVWP RRRRRR	166	6	33.33%	0.00%	
mH3_K4Me3_1	ART-K(Me3)-QTAR KSTGGKAPRKQLA	88	6	100.00%	0.00%	0.00%
mH4_K16Ac_1	SGRGKGGKGLGK GGA-K(Ac)-RHRK	137	8	100.00%	0.00%	0.00%
mH2A_1	SGRGKQGGKARA KAKTRSSR	62	8	100.00%	0.00%	0.00%
SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C	Ac-SNYSAibADKAi bANAibADDAibAE AibAKENSGGGGS GGGGSRRRRRRRR R	170	9	19.15%	21.28%	59.57%
cKit_rmSCF_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGG GSGGGGSEKFILK VRPAFKAV	162	10			

[0448]

표 3

표 3. 하기 실험에 사용된 페이로드.

페이로드	뉴클레오티드	단일 또는 이중 가닥?	단백질 분자량
BLOCK-iT Alexa Fluor 555 siRNA	20	2	N/A
NLS-Cas9-EGFP + gRNA	98	1	186229.4531
Cy5 EGFP mRNA	998	1	N/A
VWF-GFP pDNA + Cy5 PNA	13000	2	N/A

[0449]

표 4

표 4. 하기 실험에 사용된 구성요소에 대한 가이드 키. 키: N="나노입자"; cat.="양이온"; an.="음이온"; spec.="종"; c:p= "카르복실:포스페이트";

프로젝트 코드	N	페이로드 (Pl)	표적화 리간드 (TL)	Cat. Spec.	An. Spec.	C:P 비	+/- 비
TCell.001	1	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	N/A	PLR10	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	2	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	N/A	PLK10_PEG22	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	3	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	4	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	5	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	6	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	7	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	8	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	9	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	10	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	11	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	12	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	13	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	14	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	15	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR (C7-C18)	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	16	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR10	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	17	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLK10_PEG22	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	18	Cy5_EGFP_mRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	19	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	20	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	21	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	22	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	23	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	24	Cy5_EGFP_mRNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	25	Cy5_EGFP_mRNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	26	Cy5_EGFP_mRNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	27	Cy5_EGFP_mRNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	28	Cy5_EGFP_mRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	29	Cy5_EGFP_mRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1

[0450]

프로젝트 코드	N	페이로드 (Pl)	표적화 리간드 (TL)	Cat. Spec.	An. Spec.	C:P 비	+/- 비
TCell.001	30	Cy5_EGFP_mRNA	ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR (C7-C18)	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	31	VWF_GFP_Cy5_pDNA	N/A	PLR10	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	32	VWF_GFP_Cy5_pDNA	N/A	PLK10_PEG22	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	33	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	34	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	35	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	36	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	37	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	38	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	39	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	40	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	41	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	42	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	43	VWF_GFP_Cy5_pDNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	44	VWF_GFP_Cy5_pDNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	45	VWF_GFP_Cy5_pDNA	ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR (C7-C18)	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	46	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	N/A	PLR10	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	47	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	N/A	PLK10_PEG22	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	48	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	49	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	50	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	51	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	52	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	53	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	54	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	55	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	56	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	57	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	58	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	59	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	60	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_5	ALL_LIGANDS_E	TL	pLE100:p	2:1	2:1

[0451]

프로젝트 코드	N	페이로드 (PI)	표적화 리간드 (TL)	Cat. Spec.	An. Spec.	C:P 비	+/- 비
		55_siRNA	QUIMOLAR (C7-C18)		DE100		
TCell.002	61	NLS_Cas9_gRNA_RNP	N/A	PLR10	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	62	NLS_Cas9_gRNA_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	63	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	64	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	65	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	66	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N + CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	67	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N + CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_3 + CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	68	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N + CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_3 + CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C + IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
HSC.004	69	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR10	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	70	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR50	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	71	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLK10_PEG22	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	72	Cy5_EGFP_mRNA	ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	TL	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	73	Cy5_EGFP_mRNA	ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N + cKit_rmSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	74	Cy5_EGFP_mRNA	cKit_rmSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE20	2:1	2:1
CynoBM.002	75	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	N/A	PLR10	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	76	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	N/A	mH4_K16Ac_1 : mH2A_1	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	77	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	78	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	79	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	SCF_mcKit_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	80	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	d	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	81	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N + ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N + cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	82	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR50	pLE100:pDE100	2:1	2:1

[0452]

프로젝트 코드	N	페이로드 (PI)	표적화 리간드 (TL)	Cat. Spec.	An. Spec.	C:P 비	+/- 비
CynoBM.002	83	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	84	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	85	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	86	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N + ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N + cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
Blood.001	87	Cy5_EGFP_mRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100	1.35:1	0.82:1
Blood.002	88	Cy5_EGFP_mRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100	1.35:1	0.82:1
Blood.002	89	Cy5_EGFP_mRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100	1.35:1	0.82:1
Blood.002	90	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLK30_PEG113	pLE100		
Blood.002	91	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR50	pLE100		
Blood.002	92	비히클	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100	N/A	1.93:1

* 나노입자 제형에 사용된 준세포(subcellular) 운송 펩티드는 특정 페이로드에 컨쥬게이션된 핵 위치 신호 펩티드였음 (예를 들어, "NLS_Cas9…")
* 나노입자 제형에 사용된 양이온 종은 아미노산 길이가 9 (9R)인 폴리(아르기닌) 사슬로서 표적화 리간드 (TL)에 컨쥬게이션되었음. 표적화 리간드가 없는 나노입자는 AA 사슬의 길이가 10 (PLR10)인 비(非)컨쥬게이션된 양이온 종 폴리(아르기닌) 또는 AA 사슬 길이가 10 인 PEG 화 폴리(리신)을 함유하였음. 표에 모든 양이온 종은 L:D 이성질체를 1:0 의 비로 가짐.
*HSC=조혈 줄기 세포; BM=골수 세포; Tcell=T 세포; Blood=전혈; cynoBM=시노몰구스 골수.

[0453]

[0454] **물질 및 방법**

[0455] *리간드 합성*

[0456] 대부분의 표적화 리간드 서열은 자체적으로 설계하고 제3자의 상업적 공급업자에 의해 맞춤 제작되었다. 펩티드 리간드는 천연 폴리펩티드 서열에서 유도되었으며, 일부 경우에서, 결합 친화성을 개선시키기 위해 돌연변이를 만들었다. 결합 동력학 및 최적의 돌연변이 결정의 컴퓨터 분석은 Rosetta 소프트웨어를 사용하여 달성하였다. 표적화 리간드가 자체적으로 제조된 경우, 방법 및 물질은 하기와 같았다:

[0457] 펩티드를 표준 Fmoc-기반 고체상 펩티드 합성 (SPPS)을 사용하여 합성하였다. 펩티드를 Rink-아미드 AM 수지상에 합성하였다. 아미노산 커플링을 디메틸 포름아미드 (DMF) 중에서 O-(1H-6-클로로벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 (HCTU) 커플링 시약 및 N-메틸모르폴린 (NMM)을 이용하여 수행하였다. 펩티드의 탈보호 및 절단을 트리플루오로아세트산 (TFA), 트리이소프로필 실란 (TIPS) 및 물을 이용하여 수행하였다. 미정제 펩티드 혼합물을 역상 HPLC (RP-HPLC)로 정제하였다. 순수한 펩티드 분획을 동결 및 동결건조시켜, 정제된 펩티드를 수득하였다.

[0458] *나노입자 합성*

[0459] 나노입자를 양이온 구성요소와 음이온 구성요소 사이에, 실온, 37℃, 또는 37℃와 실온 사이에서 합성하였다. 용액을 양이온 구성요소와 음이온 구성요소의 혼합 동안 자연적인 정전기적 상호작용을 이용하여 수성 완충액으로 제조하였다. 시작 시, 음이온 구성요소를 Tris 완충액 (30mM - 60mM; pH = 7.4 - 9) 또는 HEPES 완충액 (30mM, pH = 5.5)에 용해시키고, 양이온 구성요소를 HEPES 완충액 (30mM - 60mM, pH = 5 - 6.5)에 용해시켰다.

[0460] 특히, 페이로드 (예를 들어, 유전 물질 (RNA 또는 DNA), 유전 물질-단백질-핵 위치 신호 폴리펩티드 복합체 (리보핵단백질), 또는 폴리펩티드)를 염기성, 중성 또는 산성 완충액에서 재구성하였다. 분석을 위하여, 형광단으로 공유 결합적으로 태깅되거나 또는 형광단을 유전적으로 인코딩하도록 페이로드를 제조하였다. pDNA 페이로드의 경우, TATATA 탠덤 반복에 특이적인 Cy5-태깅된 펩티드 핵산 (PNA)을 사용하여, 형광 리포터 벡터 및 형광 리포터-치료 유전자 벡터를 형광적으로 태깅하였다. 또한 음으로 하전된 응축 종 (예를 들어 폴리(글루탐산))으로서 작용할 수 있는 지속-방출형 구성요소를 또한 염기성, 중성 또는 산성 완충액에서 재구성하였다. 링커-앵커 서열에 컨쥬게이션된 야생형 유래 또는 야생형 돌연변이된 표적화 펩티드를 갖는 표적화 리간드를 산성 완충액에서 재구성하였다. 부가적인 응축 종 또는 핵 위치 신호 펩티드가 나노입자에 포함되는 경우, 이를 또한 양이온 종에 대해 0.03% w/v, 및 음이온 종에 대해 0.015% w/v 작업 용액으로서 완충액에서 재구성하였다. 또한 양이온 종에 대해 0.1% w/v 및 음이온 종에 대해 0.1% w/v 작업 용액을 이용하여 실험을 수행하였다. 유전 물질과 복합체를 형성하는 것을 제외한 모든 폴리펩티드를, 가용화를 개선시키기 위해 10분 동안 초음파 처리하

였다.

[0461] 이어서, 나노입자의 각각의 별도로 재구성된 구성요소를, 조사하고자 하는 첨가 순서대로 혼합하였다. 조사된 상이한 첨가 순서는 하기와 같다:

[0462] 1) 페이로드 < 양이온 종

[0463] 2) 페이로드 < 양이온 종 (앵커) < 양이온 종 (앵커-링커-리간드)

[0464] 3) 페이로드 < 음이온 종 < 양이온 종

[0465] 4) 페이로드 < 양이온 종 < 음이온 종

[0466] 5) 페이로드 < 양이온 종 (앵커) < 양이온 종 (앵커-링커-리간드) < 음이온 종

[0467] 6) 페이로드 < 음이온 종 < 양이온 종 (앵커) + 양이온 종 (앵커-링커-리간드)

[0468] 7) 페이로드 + 음이온 종 < 양이온 종 (앵커) + 양이온 종 (앵커-링커-리간드)

[0469] 8) 페이로드 1 (리보핵단백질 또는 다른 유전/단백질 물질) < 양이온 종 (히스톤 단편, NLS, 또는 링커-리간드 미함유의 하전된 폴리펩티드 앵커) < 음이온 종

[0470] 9) 페이로드 1 (리보핵단백질 또는 다른 유전/단백질 물질) < 양이온 종 (히스톤 단편, NLS, 또는 링커-리간드 미함유의 하전된 폴리펩티드 앵커) < 음이온 종 < 양이온 종 (히스톤 단편, NLS, 또는 링커-리간드 함유 또는 미함유의 하전된 폴리펩티드 앵커)

[0471] 10) 페이로드 1 (리보핵단백질 또는 다른 유전/단백질 물질) < 양이온 종 (히스톤 단편, NLS, 또는 링커-리간드 미함유의 하전된 폴리펩티드 앵커) < 페이로드 2/3/4 (하나 이상의 페이로드) < 양이온 종 (히스톤 단편, NLS, 또는 링커-리간드 함유 또는 미함유의 하전된 폴리펩티드 앵커)

[0472] 11) 페이로드 1 (리보핵단백질 또는 다른 유전/단백질 물질) < 양이온 종 (히스톤 단편, NLS, 또는 링커-리간드 미함유의 하전된 폴리펩티드 앵커) < 페이로드 2/3/4 (하나 이상의 페이로드) + 음이온 종 < 양이온 종 (히스톤 단편, NLS, 또는 링커-리간드 함유 또는 미함유의 하전된 폴리펩티드 앵커)

[0473] 12) 페이로드 1/2/3/4 (하나 이상의 리보핵단백질, 단백질 또는 핵산 페이로드) + 음이온 종 < 양이온 종 (히스톤 단편, NLS, 또는 링커-리간드 함유 또는 미함유의 하전된 폴리펩티드 앵커)

[0474] 13) 페이로드 1/2/3/4 (하나 이상의 리보핵단백질, 단백질 또는 핵산 페이로드) < 양이온 종 (히스톤 단편, NLS, 또는 링커-리간드 함유 또는 미함유의 하전된 폴리펩티드 앵커)

[0475] **세포 배양**

[0476] *T 세포*

[0477] 트랜스펙션 24시간 전, 20M 인간 1차 Pan-T 세포 (Stemcell #70024)를 함유하는 크리오바이알(cryovial)을 해동시키고, 4개의 96-웰 플레이트의 4x66 웰에 200㎕ 및 75,000 세포/웰 (1.5E6 세포/ml)로 씨딩(seeding)하였다. 세포를 10% FBS 및 L-글루타민이 보충된 항생제 미함유 RPMI 1640 배지 (Thermofisher #11875119)에서 배양하고, 매 2일마다 배지를 교환하면서 유지시켰다.

[0478] *조혈 줄기 세포 (HSC)*

[0479] 트랜스펙션 24시간 전, 500k 인간 1차 CD34+ 세포 (Stemcell # 70002)를 함유하는 크리오바이알을 해동시키고, 96-웰 플레이트의 48개의 웰에 200㎕ 및 웰 당 10-12k 세포로 씨딩하였다. 배양 배지는 10% FBS, 25ng/ml TPO, 50ng/ml Flt-3 리간드 및 50ng/ml SCF가 보충된 Stemspan SFEM II (Stemcell #09605)로 이루어져 있었으며, 세포를 매 2일마다 배지를 교환하면서 유지시켰다.

[0480] *시노몰구스 골수 (HSC)*

[0481] 트랜스펙션 48시간 전, 1.25M 시노몰구스 원숭이 골수 세포 (IQ Biosciences # IQB-MnBM1)를 함유하는 크리오바이알을 해동시키고, 둥근 바닥 96-웰 플레이트의 48개의 웰에 200㎕ 및 ~30k 세포/웰로 씨딩하였다. 세포를 12% FBS가 보충된 항생제 미함유 RPMI 1640에서 배양시키고, 매 2일마다 배지를 교환하면서 유지시켰다.

[0482] *인간 전혈*

[0483] 5mL의 전혈을 정맥 천자를 통해 채혈하였다. 1mL를 14mL의 PBS와 혼합하였다. 나노입자를 15mL 튜브에 직접 트랜스펙션하거나, 또는 100μl의 혈액을 나노입자 트랜스펙션 전 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 적정하였다.

[0484] *트랜스펙션*

[0485] 나노입자의 스톡 용액을 형성한 후, 10μl의 나노입자를 96-웰 플레이트의 웰 마다 첨가하고, 세포 배양 조건 또는 배지의 보충물 (표 5 참조)의 변화 없이 인큐베이션하였다. 96-웰 플레이트를 CO2 및 온도 제어된 환경 하에서 BioTek Cytation 5를 통한 생세포 이미지화 동안 유지하였다.

표 5

표 5.

페이로드	**웰 당 투여량 (96 웰 플레이트)**	**나노입자 현탁액의 부피**
mRNA	100ng mRNA	10ul
CRISPR RNP	100ng sgRNA,	10ul
pDNA	200ng pDNA	10ul
siRNA	50ng	10ul

[0486]

[0487] **분석**

[0488] *응축 및 내포 곡선*

[0489] 0.0044ug/μl의 헤모글로빈 서브유닛 베타 (HBB) gRNA 또는 pDNA 결합 부위를 갖는 본 빌레브란트 인자 (VWF)-EGFP-pDNA 또는 mRNA 또는 siRNA함유 50μl 용액을, 30 mM Tris 완충액 (pH = 7.4 - 8.5) 중에 현탁된 SYBR 0.4x 1 μl와 혼합하여 응축 곡선을 생성하였다. HBB gRNA는 RNP와의 복합체로서 존재하였다. 인터칼레이션된 SYBR Gold로부터의 형광 방사를 PLE20, PLE35, PLE100 또는 PLE100:PDE100 (D:L비 1:1)의 단일 첨가 전후에 모니터링하였고, 여기서 카르복실레이트-대-포스페이트 (C:P) 비는 1 내지 150 범위였다. 그 후, 양이온 종을 목적하는 아민 대 포스페이트 (N:P), 또는 아민 대 포스페이트+카르복실레이트 [N:(P+C)] 비에 이르도록 첨가하였다. 대표적인 양이온 종은, PLR10, PLR50, PLR150, 앵커-링커 펩티드, 하전된 폴리(아르기닌) 사슬에 컨쥬게이션된 GGGGSGGGGS (서열 번호 146) 링커에 컨쥬게이션된 다양한 돌연변이된 표적화 리간드 (즉 내부 명칭: SCF_mcKit_(4GS)2_9R_C), 히스톤_H3K4(Me3) 펩티드 [1-22] (mH3_K4Me3_1), 히스톤_H4K16(Ac) 펩티드 [1-20] (mH4_K16Ac_1), 히스톤_H2펩티드 [1-20] (mH2A_1) (상이한 양전하 대 음전하 비 (CR)에 상응하여)를 포함하였다. 일부 실험에서, 양이온 종을 상기 지침에 따라 음이온 종 전에 첨가하였다.

[0490] Tris 완충액 30 mM (pH = 7.4)에 희석된 SYBR GOLD 0.2x를, 상이한 나노입자 제형에 캡슐화된 공지된 양 (100 내지 600 ng)의 VWF-EGFP-pDNA, gRNA HBB, Alexa555 Block-IT-siRNA를 함유하는 60 mM HEPES (pH = 5.5) 용액 중 현탁된 나노입자에 다중 첨가하여, 내포 곡선을 수득하였다.

[0491] GFP 채널에서 인터칼레이션된 SYBR Gold로부터의 형광 방사를, 시너지 Neo2 하이브리드 멀티모드 판독기 (Synergy Neo2 Hybrid Multi-mode reader) (Biotek, USA) 또는 CLARIOstar 마이크로플레이트 판독기 (CLARIOstar Microplate reader) (BMG, Germany)를 사용하여, 평면 바닥, 절반 영역, 96 웰-플레이트에 기록하였다.

[0492] *나노입자 추적 분석 (제타)*

[0493] 나노입자 제형의 유체역학적 직경 및 제타 전위를 ZetaView 장비 (Particle Metrix, Germany)를 사용하여 나노입자 추적 분석으로 조사하였다. 샘플을 장비에 주입하기 전 PBS (1:12) 중에 1:100 로 희석하였다. 측정치를

수득하기 위해, 카메라 세팅을 분석 전 최적의 감도 및 입자/프레임 (~100-150)으로 조정하였다.

[0494] *형광 현미경 - BioTek Cytation 5*

[0495] Cytation 5 고함량 스크리닝 생세포 이미지화 현미경 (BioTek, USA)을 사용하여, 유동 세포 계측법으로 평가 전 트랜스펙션 효율을 이미지화하였다. 간략하게, GFP 및/또는 Cy5 채널뿐 아니라 10x 대물렌즈 하에의 명시야를 이용하여, 세포를 트랜스펙션 전, 트랜스펙션 후 4시간 동안 15분 증분으로, 이후 12시간 동안 2시간 증분으로 이미지화하였다. 이어서, 이미지를 연속적 또는 별개의 동력학의 대표로서 1-18, 24, 36 또는 48-시간 지점에서 수집하였다.

[0496] *유동 세포 계측법*

[0497] 세포 배지를 제거하기 위한 세척 단계 후, Zombie NIR 생존력 키트 염색 및/또는 실온에서 30분 동안 PBS 중에 용해시킨 CellEvent™ Caspase-3/7 Green (Invitrogen, U.S.A.)와 함께 세포를 인큐베이션함으로써, 세포 라벨링 실험을 수행하였다. 생존력 라벨링 혼합물의 총 부피는 웰 당 25 μl였다. 이어서, 형광 1차 항체의 패널을 혼합물에 첨가하고 (웰 당 각각의 항체 0.25 μl), 15분 동안 인큐베이션하였다. 양성 대조군 및 음성 단일-채널 대조군을 UltraComp eBeads 보상 비드 (Compensation Beads) 및 음성 비드 (Negative Beads), 또는 생세포의 Cy5 핵 염색을 이용하여 생성하였다. 모든 인큐베이션 단계를 암실에서 회전식 교반기 상에서 수행하였다. 상이한 채널 간 적절한 보상이 적용된 후 Attune NxT 유동 세포 측정기 (ThermoFisher, USA)를 사용하여 생세포에 대하여 Attune 다중파라미터 유동 세포 계측 측정을 수행하였다. 전방 및 측면 산란 강도의 적절한 게이트의 선택에 의해, 세포의 대표적인 집단을 선택하였다. 적어도 10000개의 사건이 수집될 때까지, 세포 형광의 검출을 계속하였다.

[0498] **결과/데이터**

[0499] **도 8 - 도 33: 응축 데이터**

[0500] **도 8. (a)** SYBR Gold로 초기에 인터칼레이션된 PNA 페이로드와 VWF-EGFP pDNA를 함유하는 나노입자에서, 양전하 대 음전하 비 (CR)의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 범례에 제시된 카르복실레이트 대 포스페이트 (C:P) 비는, 음이온성 폴리펩티드 종 (PLE100) 상의 카르복실레이트기 대 페이로드의 유전 물질 상의 포스페이트기의 나노입자의 비를 기반으로 한다.

[0501] CR을 양이온성 PLR150의 단계적인 첨가를 통해 증가시켰다. 관찰된 형광 감소는, PLR150의 첨가를 통해 CR이 증가하면, 입자가 응축됨에 따라, SYBR이 페이로드로부터 벗어나게 된다는 것을 보여준다. 추가적으로, 응축은 다양한 c:p 비에 걸쳐 일관되게 유지된다. 블랭크 용액은 페이로드의 부재 하에 SYBR Gold를 함유한다. **(b)** PLE100을 함유하지 않는 나노입자에서 양전하 대 음전하 비 (CR)의 함수로서의 형광 강도 변화.

[0502] **도 9.** SYBR Gold로 초기에 인터칼레이션된 HBB gRNA 페이로드와 복합체화된 NLS-CAS9-NLS RNP를 함유하는 나노입자에서, 양전하 대 음전하 비 (CR*)의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 추가적으로, CR*의 결정은 cas9와의 복합체화에 의해 차폐된 gRNA의 음으로 하전된 부분을 포함하지 않는다. 범례에 제시된 카르복실레이트 대 포스페이트 (C:P) 비는, 음이온성 폴리펩티드 종 (PLE100) 상의 카르복실레이트기 대 페이로드의 유전 물질 상의 포스페이트기의 나노입자의 비를 기반으로 한다.

[0503] CR을 양이온성 PLR150의 단계적인 첨가를 통해 증가시켰다. 블랭크 용액은 페이로드의 부재 하에 SYBR Gold를 함유한다. 관찰된 형광 감소는, PLR150의 첨가를 통해 CR이 증가하면, 입자가 응축됨에 따라, SYBR이 페이로드로부터 벗어나게 된다는 것을 보여준다. 추가적으로, 응축은 다양한 c:p 비에 걸쳐 일관되게 유지된다.

[0504] **도 10.** SYBR Gold로 초기에 인터칼레이션된 gRNA HBB 페이로드를 함유하는 나노입자에서, 양전하 대 음전하 비 (CR)의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 범례에 제시된 카르복실레이트 대 포스페이트 (C:P) 비는, 음이온성 폴리펩티드 종 (PLE100) 상의 카르복실레이트기 대 페이로드의 유전 물질 상의 포스페이트기의 나노입자의 비를 기반으로 한다.

[0505] CR을 PLR150의 단계적인 첨가를 통해 증가시켰다. 블랭크 용액은 페이로드의 부재 하에 SYBR Gold를 함유한다. 관찰된 형광 감소는, PLR150의 첨가를 통해 CR이 증가하면, 입자가 응축됨에 따라, SYBR이 페이로드로부터 벗어나게 된다는 것을 보여준다. 추가적으로, CR에 대한 응축은 다양한 C:P 비에 걸쳐 일관되게 유지된다.

표 6

표 6: 일부 제형에 대한 유체역학적 직경 및 제타 전위를 응축 종점에서 측정하여, 하기 표에 보고하였다.

페이로드	C:P	유체역학적 직경 [nm]	제타 전위 [mV]
pDNA	0	120 ± 49	-
HBB gRNA	0	99 ± 32	6.7 ± 0.6
RNP (NLS-Cas9-NLS 및 HBB gRNA)	0	90 ± 36	-0.6 ± 0.9
RNP (NLS-Cas9-NLS 및 HBB gRNA	15	110 ± 49	26.7 ± 1
pDNA	15	88 ± 49	11.7 ± 0.6

[0506]

[0507] *도 11 - 도 13: 양이온성 물질로서 펩티드 SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C를 이용한 응축 곡선*

[0508] **도 11. (a)(b)** SYBR Gold로 초기에 인터칼레이션된 HBB gRNA 페이로드를 함유하는 나노입자에서, 양전하 대 음전하 비 (CR)의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 범례에 제시된 카르복실레이트 대 포스페이트 (C:P) 비는, 음이온성 폴리펩티드 종 (PLE100) 상의 카르복실레이트기 대 페이로드의 유전 물질 상의 포스페이트기의 나노입자의 비를 기반으로 한다.

[0509] CR을 양으로 하전된 폴리(아르기닌)에 컨쥬게이션된 (GGGS)2 링커에 컨쥬게이션된 양이온성 돌연변이된 cKit 표적화 리간드 (내부 리간드 명칭: SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C)의 단계적인 첨가를 통해 증가시켰다. 관찰된 형광 감소는, SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C의 첨가를 통해 CR이 증가하면, 입자가 응축됨에 따라, SYBR이 페이로드로부터 벗어나게 된다는 것을 보여준다. 추가적으로, 응축은 다양한 c:p 비에 걸쳐 일관되게 유지된다. 블랭크 용액은 페이로드의 부재 하에 SYBR Gold를 함유한다.

[0510] **도 12. (a)(b)** SYBR Gold로 초기에 인터칼레이션된 HBB gRNA 페이로드와 복합체화된 NLS-CAS9-NLS RNP를 함유하는 나노입자에서, 양전하 대 음전하 비 (CR)의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 범례에 제시된 카르복실레이트 대 포스페이트 (C:P) 비는, 음이온성 폴리펩티드 종 (PLE100) 상의 카르복실레이트기 대 페이로드의 유전 물질 상의 포스페이트기의 나노입자의 비를 기반으로 한다.

[0511] CR을 양으로 하전된 폴리(아르기닌)에 컨쥬게이션된 (GGGS)2 링커에 컨쥬게이션된 양이온성 돌연변이된 cKit 표적화 리간드 (내부 리간드 명칭: SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C)의 단계적인 첨가를 통해 증가시켰다. 관찰된 형광 감소는, SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C의 첨가를 통해 CR이 증가하면, 입자가 응축됨에 따라, SYBR이 페이로드로부터 벗어나게 된다는 것을 보여준다. 추가적으로, 응축은 다양한 c:p 비에 걸쳐 일관되게 유지된다. 블랭크 용액은 페이로드의 부재 하에 SYBR Gold를 함유한다.

[0512] **도 13. (a)(b)** SYBR Gold로 초기에 인터칼레이션된 PNA 페이로드와 VWF-EGFP pDNA를 함유하는 나노입자에서, 양전하 대 음전하 비 (CR)의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 범례에 제시된 카르복실레이트 대 포스페이트 (C:P) 비는, 음이온성 폴리펩티드 종 (PLE100) 상의 카르복실레이트기 대 페이로드의 유전 물질 상의 포스페이트기의 나노입자의 비를 기반으로 한다.

[0513] CR을 양으로 하전된 폴리(아르기닌)에 컨쥬게이션된 (GGGS)2 링커에 컨쥬게이션된 양이온성 돌연변이된 cKit 표적화 리간드 (내부 리간드 명칭: SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C)의 단계적인 첨가를 통해 증가시켰다. 관찰된 형광 감소는, SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C의 첨가를 통해 CR이 증가하면, 입자가 응축됨에 따라, SYBR이 페이로드로부터 벗어나게 된다는 것을 보여준다. 추가적으로, 응축은 다양한 c:p 비에 걸쳐 일관되게 유지된다. 블랭크 용액은 페이로드의 부재 하에 SYBR Gold를 함유한다.

[0514] *도 14 - 도 15: 양이온성 물질로서 히스톤 H3K4Me를 이용한 응축 곡선*

[0515] **도 14.** SYBR Gold로 초기에 인터칼레이션된 PNA 페이로드와 VWF-EGFP pDNA를 함유하는 나노입자에서, 양전하 대 음전하 비 (CR)의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 범례에 제시된 카르복실레이트 대 포스페이트 (C:P) 비는, 음이온성 폴리펩티드 종 (PLE100) 상의 카르복실레이트기 대 페이로드의 유전 물질 상의 포스페이트기의 나노입자의 비를 기반으로 한다. CR을 양이온성 돌연변이된 히스톤_H3K4(Me3) 펩티드

[1-22] (내부 펩티드 명칭 mH3_K4Me3_1)의 단계적인 첨가를 통해 증가시켰다. 관찰된 형광 변화는, PLE100의 존재 하에서, mH3_K4Me3_1의 첨가를 통해 CR이 증가하면, SYBR이 페이로드로부터 충분히 벗어나지 못하게 된다는 것을 보여준다. 블랭크 용액은 페이로드의 부재 하에 SYBR Gold를 함유한다.

[0516] **도 15. (a)** SYBR Gold로 초기에 인터칼레이션된 HBB gRNA 페이로드와 복합체화된 NLS-CAS9-NLS RNP를 함유하는 나노입자에서, 양전하 대 음전하 비 (CR)의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 범례에 제시된 카르복실레이트 대 포스페이트 (C:P) 비는, 음이온성 폴리펩티드 종 (PLE100) 상의 카르복실레이트기 대 페이로드의 유전 물질 상의 포스페이트기의 나노입자의 비를 기반으로 한다. CR을 양이온성 돌연변이된 히스톤_H3K4(Me3) 펩티드 [1-22] (내부 펩티드 명칭 mH3_K4Me3_1)의 단계적인 첨가를 통해 증가시켰다. 관찰된 형광 변화는, PLE100의 존재 하에서, mH3_K4Me3_1의 첨가를 통해 CR이 증가하면, SYBR이 페이로드로부터 지속적으로 벗어나지 못하게 된다는 것을 보여준다. 하지만, 히스톤_H3K4(Me3)은 음이온성 폴리펩티드의 부재 하 CR ≤ 8:1에서 효과적인 응축제인 것으로 나타났다.

[0517] *도 16 - 도 19: 양이온성 물질로서 펩티드 CD45_aSiglec_(4GS)2_9R_C를 이용한 응축 곡선*

[0518] **도 16.** SYBR Gold로 초기에 인터칼레이션된 PNA 페이로드와 VWF-EGFP pDNA를 함유하는 나노입자에서, 양전하 대 음전하 비 (CR)의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 범례에 제시된 카르복실레이트 대 포스페이트 (C:P) 비는, 음이온성 폴리펩티드 종 (PLE100) 상의 카르복실레이트기 대 페이로드의 유전 물질 상의 포스페이트기의 나노입자의 비를 기반으로 한다.

[0519] CR을 양으로 하전된 폴리(아르기닌)에 컨쥬게이션된 (GGGS)2 링커에 컨쥬게이션된 양이온성 돌연변이된 CD45 수용체 표적화 리간드 (내부 리간드 명칭: CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C)의 단계적인 첨가를 통해 증가시켰다. 비어있는 (empty) 기호들은 페이로드가 없는 경우 SYBR Gold를 함유하는 블랭크 용액을 나타낸다.

[0520] 관찰된 형광 감소는, CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C의 첨가를 통해 CR이 증가하면, 입자가 응축됨에 따라, SYBR이 페이로드로부터 벗어나게 된다는 것을 보여준다. 추가적으로, 응축은 다양한 c:p 비에 걸쳐 일관되게 유지된다.

[0521] **도 17.** SYBR Gold로 초기에 인터칼레이션된 Cy5-EGFP mRNA 페이로드를 함유하는 나노입자에서, 양전하 대 음전하 비 (CR)의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 범례에 제시된 카르복실레이트 대 포스페이트 (C:P) 비는, 음이온성 폴리펩티드 종 (PLE100) 상의 카르복실레이트기 대 페이로드의 유전 물질 상의 포스페이트기의 나노입자의 비를 기반으로 한다.

[0522] CR을 양으로 하전된 폴리(아르기닌)에 컨쥬게이션된 (GGGS)2 링커에 컨쥬게이션된 양이온성 돌연변이된 CD45 수용체 표적화 리간드 (내부 리간드 명칭: CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C)의 단계적인 첨가를 통해 증가시켰다. 관찰된 형광 감소는, CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C의 첨가를 통해 CR이 증가하면, 입자가 응축됨에 따라, SYBR이 페이로드로부터 벗어나게 된다는 것을 보여준다. 추가적으로, 응축은 다양한 c:p 비에 걸쳐 일관되게 유지된다.

[0523] **도 18.** SYBR Gold로 초기에 인터칼레이션된 BLOCK-iT Alexa Fluor 555 siRNA 페이로드를 함유하는 나노입자에서, 양전하 대 음전하 비 (CR)의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 범례에 제시된 카르복실레이트 대 포스페이트 (C:P) 비는, 음이온성 폴리펩티드 종 (PLE100) 상의 카르복실레이트기 대 페이로드의 유전 물질 상의 포스페이트기의 나노입자의 비를 기반으로 한다. CR을 양으로 하전된 폴리(아르기닌)에 컨쥬게이션된 (GGGS)2 링커에 컨쥬게이션된 양이온성 돌연변이된 CD45 수용체 표적화 리간드 (내부 리간드 명칭: CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C)의 단계적인 첨가를 통해 증가시켰다. 관찰된 형광 감소는, CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C의 첨가를 통해 CR이 증가하면, 입자가 응축됨에 따라, SYBR이 페이로드로부터 벗어나게 된다는 것을 보여준다. 추가적으로, 응축은 다양한 c:p 비에 걸쳐 일관되게 유지된다.

[0524] **도 19. (a)** SYBR Gold로 초기에 인터칼레이션된 HBB gRNA 페이로드와 복합체화된 NLS-Cas9-EGFP RNP를 함유하는 나노입자에서, 양전하 대 음전하 비 (CR)의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 범례에 제시된 카르복실레이트 대 포스페이트 (C:P) 비는, 음이온성 폴리펩티드 종 (PLE100) 상의 카르복실레이트기 대 페이로드의 유전 물질 상의 포스페이트기의 나노입자의 비를 기반으로 한다.

[0525] CR을 양으로 하전된 폴리(아르기닌)에 컨쥬게이션된 (GGGS)2 링커에 컨쥬게이션된 양이온성 돌연변이된 CD45 수용체 표적화 리간드 (내부 리간드 명칭: CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C)의 단계적인 첨가를 통해 증가시켰다. 속이 채워진(filled) 기호는 페이로드의 부재 하에 SYBR Gold를 함유하는 블랭크 용액을 나타낸다.

[0526] 관찰된 형광 감소는, CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C의 첨가를 통해 CR이 증가하면, 입자가 응축됨에 따라, SYBR이

페이로드로부터 벗어나게 된다는 것을 보여준다. 추가적으로, 응축은 다양한 c:p 비에 걸쳐 일관되게 유지된다.

[0527] (b) PLE를 함유하지 않고 전하 비가 22인 나노입자에 대한 유체역학적 직경 분포의 대표적인 이미지. 평균 직경은 <d> = 134 nm ±65이다.

표 7

표 7: 일부 제형에 대한 유체역학적 직경 및 제타 전위를 응축 종점에서 측정하고, 하기 표에 보고하였다.

[0528]

페이로드	C:P	양이온성 펩티드	유체역학적 직경 [nm]	제타 전위 [mV]
RNP (NLS-Cas9-EGFP 및 gRNA)	0	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	134±65	13±1
RNP (NLS-Cas9-EGFP 및 gRNA	10	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	166 ±75	19.2±1
RNP (NLS-Cas9-EGFP 및 gRNA	20	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	179±92	21±1

[0529] *도 20 - 도 23: 내포 곡선*

[0530] **도 20.** BLOCK-iT Alexa Fluor 555 siRNA 페이로드 150 ng을 모두 함유하는 상이한 나노입자 제형에 대한 단계적 SYBR 첨가의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 내포 검정. SYBR 0 µl 내지 50 µl에서의 형광 변화 델타는 나노입자 제형의 안정성을 나타낸다. 제형이 덜 안정하게 응축될수록, SYBR Gold가 유전적 페이로드에 더 많이 인터칼레이션되게 된다. 리포펙타민 RNAiMAX는 여기서 양성 대조군으로서 사용된다. 표 2-4.

[0531] **도 21.** HBB gRNA 페이로드 300ng을 모두 함유하는 상이한 나노입자 제형에 대한 단계적 SYBR 첨가의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 내포 검정. SYBR 0 µl 내지 50 µl에서의 형광 변화 델타는 나노입자 제형의 안정성을 나타낸다. 제형이 덜 안정하게 응축될수록, SYBR Gold가 유전적 페이로드에 더 많이 인터칼레이션되게 된다. 리포펙타민 CRISPRMAX는 여기서 양성 대조군으로서 사용된다. 표 2-4.

[0532] **도 22.** Cy5 EGFP mRNA 페이로드를 모두 함유하는 상이한 나노입자 제형에 대한 단계적 SYBR 첨가의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 내포 검정. SYBR 0 µl 내지 50 µl에서의 형광 변화 델타는 나노입자 제형의 안정성을 나타낸다. 제형이 덜 안정하게 응축될수록, SYBR Gold가 유전적 페이로드에 더 많이 인터칼레이션되게 된다. 리포펙타민 Messenger MAX는 여기서 양성 대조군으로서 사용된다. 표 2-4.

[0533] **도 23.** Cy5 태깅된 펩티드 핵산 (PNA) 결합 부위 페이로드를 갖는 VWF-EGFP pDNA 600 ng을 모두 함유하는 상이한 나노입자 제형에 대한 단계적 SYBR 첨가의 함수로서의 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 내포 검정. SYBR 0 µl 내지 50 µl에서의 형광 변화 델타는 나노입자 제형의 안정성을 나타낸다. 제형이 덜 안정하게 응축될수록, SYBR Gold가 유전적 페이로드에 더 많이 인터칼레이션되게 된다. 리포펙타민 3000은 여기서 양성 대조군으로서 사용된다. 표 2-4.

[0534] *도 24 - 도 33: TC.001에 대한 SYBR 배제/응축 검정 (표 2-4 참조)*

[0535] 이러한 데이터는, 실험 TC.001에 사용된 제형이 안정하다는 것을 보여주며, 나아가 H2A 및 H4 히스톤 테일 펩티드가, H3과 달리, 모든 열거된 페이로드에 대해 그 자체로 효과적인 응축제라는 것을 보여준다. 또한, H2A 및 H4가 앵커-링커-리간드로 추가로 조합될 수 있다는 것을 보여준다. 최종적으로, 음이온성 중합체 (이 구현예에서, PLE100)의 후속 첨가는, 음이온성 중합체에의 첨가 전, 핵산 또는 리보핵단백질 페이로드에 컨쥬게이션된 다양한 앵커-링커-리간드 펩티드 상에서의 크기 및 제타 전위 측정을 통해 입증된 바와 같이, 입자 안정성에 영향을 미치지 않거나, 안정성을 증진시킨다는 증거로 제시된다.

[0536] **도 24.** RNP에의 양이온성 폴리펩티드 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C, 이어서 PLE100의 첨가, 및 양이온성 폴리펩티드의 추가 첨가에 의한 형광 강도 감소를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정. 형광 배경 신호는 RNP로부터의 GFP 형광으로 인해 확인된다.

[0537] **도 25.** siRNA 및 SYBR Gold에의 양이온성 폴리펩티드 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C, 이어서 PLE100의 첨가, 및 양

이온성 폴리펩티드의 추가 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정.

[0538] **도 26.** HBB gRNA 및 SYBR Gold를 갖는 NLS-Cas9-EGFP의 RNP에의, 양이온성 폴리펩티드 히스톤 펩티드 H2A, 이어서 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C의 첨가, 및 PLE100의 추가 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정.

[0539] **도 27.** HBB gRNA 및 SYBR Gold를 갖는 NLS-Cas9-EGFP의 RNP에의, 양이온성 폴리펩티드 히스톤 펩티드 H4와 함께 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C의 첨가, 및 PLE100의 추가 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정.

[0540] **도 28.** mRNA에의, 양이온성 폴리펩티드 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C의 첨가, 및 PLE100의 추가 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정.

[0541] **도 29.** mRNA에의, 히스톤 H4의 첨가, 및 CD45-mSiglec-(4GS)2_9R_c 및 PLE100의 추가 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정.

[0542] **도 30.** mRNA 에의, 히스톤 H2A의 첨가, 및 CD45-mSiglec-(4GS)2_9R_c 및 PLE100의 추가 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, SYBR Gold 배제 검정.

[0543] **도 31.** 양이온성 폴리펩티드 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C, 이어서 PLE100의 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, VWF_EGFP pDNA로의 인터칼레이션으로부터의 SYBR Gold 배제 검정.

[0544] **도 32.** 히스톤 H4, 이어서 양이온성 폴리펩티드 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C, 이어서 PLE100의 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, VWF_EGFP pDNA로의 인터칼레이션으로부터의 SYBR Gold 배제 검정.

[0545] **도 33.** 히스톤 H4, 이어서 양이온성 폴리펩티드 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C, 이어서 PLE100의 첨가에 의한 형광 강도 변화를 나타내는, VWF_EGFP pDNA로의 인터칼레이션으로부터의 SYBR Gold 배제 검정.

[0546] **도 34 - 도 72: 물리화학적 데이터**

[0547] 입자 크기 및 제타 전위는 콜로이드 나노물질의 특징분석에 사용되는 일반적인 측정치이다. 이러한 측정치는 주로 광 산란 기술, 예컨대 DLS (동적 광 산란)을 통해 획득된다. 나노입자 추적 분석 (NTA)은 레이저 산란 현미경 및 이미지 분석을 이용하여, 입자 크기 및 제타 전위의 측정치를 고해상도로 수득한다.

[0548] *분석*

[0549] 분산도는 샘플 이질성의 측정치로 분포에 의해 결정되며, 낮은 표준 편차 및 단일 피크는 입자 균일성을 나타낸다.

[0550] 리간드, (GGGGS)2 링커 및 정전기적 앵커 도메인을 갖는 폴리펩티드로 이루어진 표적화 리간드를 고체상 펩티드 합성에 의해 합성하고, pEGFP-N1 플라스미드 DNA 페이로드를 운반하는 입자의 실리카 표면 (분리 가능 층)을 관능화시키는데 사용하였다. 수득한 입자 크기 및 제타 전위 분포는 ZetaVIEW 장비 (Particle Metrix, Germany)를 사용하여 나노입자 추적 분석에 의해 수득하였다.

[0551] **도 34.** (A) H3K4(Me3) 및 폴리(L-아르기닌) (29kD, n=150)과 복합체화된 pEGFP-N1 플라스미드로 이루어진, 코어 폴리플렉스 크기 분포. (B) 특징적인 음성 제타 전위 및 124nm의 평균 입자 크기를 나타내는 실리카 분리 가능 층을 갖는 도 34a의 폴리플렉스. (C) 도 34b에 제시된 입자 상에 코팅된 N 말단 앵커 및 글리신-세린 링커 ((GGGGS)2)를 갖는 E 셀렉틴 리간드.

[0552] **도 35.** 분지형 히스톤 펩티드 컨쥬게이트 파일럿 입자. C-말단 시스테인을 갖는 히스톤 H3 펩티드를 10% 측쇄 티올 치환을 갖는 48kD 폴리(L-리신)에 컨쥬게이션하였다. 원심분리 여과 및 분자량 배제에 의해 정제된 최종 생성물을, 플라스미드 DNA (pEGFP-N1)를 복합체화하는데 사용하였다. 도 35에 묘사된 수득한 측정치는, 좁은 크기 분포를 나타낸다. 플라스미드 DNA (pEGFP-N1)와 복합체화된 H3-폴리(L-리신) 컨쥬게이트의 크기 분포.

[0553] *도 36-72의 경우, 데이터는 실험 번호 (프로젝트 코드)로 색인화된다. 다수의 경우, 이는 표 4의 프로젝트 코드와 상호참조될 수 있다 (HSC=조혈 줄기 세포; BM=골수 세포; Tcell=T 세포; blood=전혈; cynoBM=시노몰구스 골수).*

[0554] **도 36**은, 프로젝트 HSC.001.001에 관련된 데이터를 제공한다.

[0555] **도 37**은, PNA-태깅된 pDNA 및 E-셀렉틴 표적화 펩티드 (ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N)와 복합체화된 H3-폴리(L-리

신) 컨쥬게이트가 사용된, 프로젝트 HSC.001.002에 관련된 데이터를 제공한다.

[0556] **도 38-도 41**은, 다양한 표적화 리간드 또는 스텔스(stealth) 분자가 (진단성 증강된 형광 적용을 위해) 실리카-코팅된 입자 및 실리카-코팅된 나노다이아몬드 상에 코팅된 실험에 대한 데이터를 제공한다. 크기 및 제타 전위 분포는 관련 통계와 함께 제시된다. 표적화 리간드는, 각각, ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N, ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_C, CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C 및 Cy5mRNA-SiO2-PEG였다.

[0557] 나노제형 및 표적화 리간드의 성능은 하기와 같이 모든 데이터에서 유의하게 개선되었다: 실리카 층의 제거 및 하전된 음이온성 분리 가능 폴리펩티드 매트릭스로의 대체는, 다양한 페이로드 및 리간드-표적화 접근법으로, 모든 제형에 걸쳐 나노입자의 트랜스펙션 효율을 유의하게 향상시켰다. 하지만, 상기 데이터에 사용된 다층화 기술뿐 아니라, 분지형 히스톤 복합체와의 향상된 응축 및 후속 펩티드 매트릭스 공학 기술 (작업예는 Tcell.001, HSC.004, CYNOBM.002, 및 Blood.002에 제시됨)은, 기술 (예를 들어, 다층화) 및 코어 생체 물질 (biomaterial)의 유연성을 입증한다 (예를 들어, 본 개시의 전문 및 후속 실험 참조). 본원에 기재된 모든 기술은 진단용 또는 치료용의 임의의 입자 코어뿐 아니라, 자가-조립 물질에도 적용될 수 있다. 예를 들어, 분지형 히스톤은 링커-리간드 도메인에 컨쥬게이션되거나, 또는 이의 다수의 구현예 및 용도와 함께 동시-응축될 수 있다.

[0558] **도 42 - 도 46** 은, 분리 가능 폴리(글루탐산) 표면 매트릭스 및 CD45 리간드와 복합체화된, Cy5-EGFP mRNA 페이로드를 운반하는 입자를 도시한다. 이러한 제형을 사용하여 제조된 나노입자는 입자 크기 및 제타 전위가 매우 균일하였다. mRNA (BLOOD.002.88)와의 SIGLEC-유래 펩티드 회합 후 첨가된 폴리(글루탐산)을 갖는 입자는, mRNA 및 폴리(글루탐산)과의 SIGLEC-유래 펩티드 회합 전 첨가된 폴리(글루탐산)을 갖는 입자보다 안정하고 단분산되었으며, 이는 특정한 첨가 순서가 보다 안정한 입자를 형성하는데 도움을 줄 수 있다는 것을 나타낸다. 추가적으로, 포스페이트-함유 핵산 없이 SIGLEC-유래 펩티드와 복합체화된 폴리(글루탐산)으로부터 형성된 입자는 고도로 음이온성이며 단분산되었다 (BLOOD.002.92). mRNA와의 PLR 회합 후 첨가된 PLE100과 PLR50로부터 형성된 입자는 고도로 안정하고, 단분산되었고, 양이온성이었다 (BLOOD.002.91). 대조적으로, PLE100 첨가 전 mRNA와의 PLK-PEG 회합은 이종 전하 분포를 갖는 매우 작은 입자를 유도하였다. 이러한 첨가 순서 및 SIGLEC-유도체 펩티드의 효능은, 유동 세포 계측 데이터에 의해 입증되었으며, 여기서 리간드-표적화된 SIGLEC-유도체 입자는 PEG화 대조군과 유사한 트랜스펙션 효율에도 불구하고, 전혈 세포에서 Cy5 강도가 거의 2자릿수 높게 얻어졌다.

[0559] **도 42**는, BLOOD.002.88로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 -3.32 +/- 0.29mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 180nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라 전혈에서 58.6% 효율의 Cy5_EGFP_mRNA 흡수를 나타냈다. 좁고 균일한 피크는 탁월한 전하 분포의 예시이며, TCELL.001.18에서의 순 음이온성 입자의 형성에서 재현 가능하였다. 이는, 전신 전달을 위한 SIGLEC-유래 표적화 펩티드의 폭넓은 적용 가능성을 입증한다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조).

[0560] **도 43**은, BLOOD.002.89로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 -0.25 +/- 0.12mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 176nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라 전혈에서 각각, 58.6% 효율의 Cy5_EGFP_mRNA 흡수를 나타냈다. 이는, 전신 전달을 위한 Siglec 유래 표적화 펩티드의 폭넓은 적용 가능성을 입증한다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조).

[0561] **도 44**는, BLOOD.002.90으로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 2.54 +/- 0.03mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 99nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라 전혈에서 각각, 79.9% 효율의 Cy5_EGFP_mRNA 흡수를 나타냈다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조).

[0562] **도 45**는, BLOOD.002.91로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 27.10 FWHM 18.40mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 130nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라 전혈에서 각각, 96.7% 효율의 Cy5_EGFP_mRNA 흡수를 나타냈다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 강하게 양으로 하전된 제타 전위는 전혈 세포에서 Cy5+ 신호의 높은 효율 및 강도를 유도하였다. 간략하게, 이러한 구현예에서, 더 큰 용량의 PLR50 (PLR50 0.1% w/v 용액 15 μl)를, 2.5 ug Cy5 mRNA (TriLink)를 갖는 100 μl pH 5.5 30 mM HEPES에 첨가하였다. 37℃에서 5분 후, PLE100 0.1% 1.5 μl를 상기 용액에 첨가하였다. 대조적으로, 다른 실험은 보다 큰 상대 부피 (총 용액 부피의 5-20%)의 PLE100을, 사전 형성된 양이온성 중합체 + 음이온성 물질 코어에 첨가하는 것을 포함하였다.

[0563] **도 46**은, BLOOD.002.92로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 -22.16 FWHM 18.40mV의 제타 전위를 가졌고,

이의 90%는 130nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는, 형광단으로 라벨링되지 않았기 때문에, 유동 세포 계측 데이터에 따라 전혈에서 검출 가능한 Cy5_EGFP_mRNA 흡수를 나타내지 않았다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 페이로드 (비히클)를 포함하지 않는 이러한 나노입자의 효과적인 응축은 또한 비(非)유전 물질 페이로드 전달, 예컨대 작은 분자 또는 화학 요법제에의 하전된 중합체의 컨쥬게이션에 영향을 미친다.

[0564] **도 47 - 도 62**는, CRISPR 리보핵단백질 (RNP) (TCELL.001.01 - TCELL.001.15), mRNA (TCELL.001.16 - TCELL.001.30), 플라스미드 DNA (TCELL.001.31 - TCELL.001.45) 및 siRNA (TCELL.001.46 - TCELL.001.60)을 함유하며, 상응하는 기에서 동일한 리간드로 패턴화된 대표적인 입자를 특징분석하기 위해 수행된 실험으로부터의 결과를 도시한다.

[0565] **도 47**은, TCELL.001.1로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 -3.24 +/- 0.32mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 77nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라, 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ pan T 세포에서 각각, 99.16% 및 98.47% 효율의 CRISPR-GFP-RNP 흡수를 나타냈다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 이러한 제형은 모든 CYNOBM.002.75뿐 아니라, CYNOBM.002.82 - CYNOBM.002.85에서 후속 적층을 위한 기질로서 작용하는 코어의 물리화학적 특성을 반영하며, 여기서 PLR10-코팅된 입자는, 다양한 D:L 비, 분자량 및 조성을 갖는 하나 이상의 음이온성 폴리펩티드, 핵산 및/또는 하전된 거대분자의 분리 가능 음이온성 코트와 복합체화되었다. TCELL.001.1은, 이어서 CYNOBM.002.82 - CYNOBM.002.85에서 하전된 중합체 또는 하전된 앵커-링커-리간드의 첨가 전, PLE100 + mRNA로 코팅되었다.

[0566] **도 48**은, TCELL.001.3으로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 -0.98 +/- 0.08mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 65nm 미만의 직경을 가졌다. 이상적인 크기 범위에도 불구하고, 이러한 나노입자는 동일한 세포 집단에서 ~99% 효율을 달성하였던 TCELL.001.1에서의 강하게 음이온성인 유사한 크기의 입자와 대조적으로, 유동 세포 계측 데이터에 따라, 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ pan T 세포에서 각각, 11.6% 및 13.2% 효율의 CRISPR-GFP-RNP 흡수를 나타냈다. 입자 크기 및 안정한 음성 제타 전위의 관계, 및 이의 방법 및 용도는, 본원에 기재된 실험을 통해 예측 가능한 제약이 되는 것으로 나타난다. 이상적인 나노입자는 대부분의 입자가 <70nm이고, <-5mV의 제타 전위를 가지며, 본원에 기재된 분리 가능 음이온성 코팅 방법뿐 아니라, CYNOBM.002에 기재된 동시 전달을 위한 다단계 적층용 분리 가능 매트릭스는, 인간 및 시노몰구스 혈액, 골수 및 상기 언급된 것 내 특정 세포로부터의 민감한 1차 세포의 안정하고 극도로 효율적인 트랜스펙션을 달성한다. TCELL.001.3의 감소된 효율은, 동일한 리간드가 이러한 특정 CRISPR 제형에 대하여 사용된 것에서 변경된 아민-대-포스페이트-대-카르복실레이트 비에서 mRNA의 안정한 응축을 달성하였던, TCELL.01.27의 결과와 현저하게 대조적이다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조).

[0567] **도 49**는, TCELL.001.13으로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 2.19 +/- 0.08mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 101nm 미만의 직경을 가졌다. 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ pan T 세포에서의 CRISPR-GFP-RNP 흡수의 효율에 대해서는 하기 유동 세포 계측법/이미지화 데이터 참조.

[0568] **도 50**은, TCELL.001.14로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 -9.37 +/- 0.16mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 111nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라, 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ pan T 세포에서 각각, 25.7% 및 28.6% 효율의 CRISPR-GFP-RNP 흡수를 나타냈다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조).

[0569] **도 51**은, TCELL.001.16으로부터의 데이터를 제공한다.

[0570] **도 52**는, TCELL.001.18로부터의 데이터를 제공한다. 이러한 입자의 크기 및 제타 전위는, 80.9nm의 평균 입자 크기 및 -20.26 +/- 0.15 mV의 제타 전위, 및 90%의 입자가 39.2 - 129.8nm 직경을 갖는다는 것을 입증하며, 이는 폴리(글루탐산)이 양이온성 앵커-링커-리간드의 내포 후 첨가된 경우, 카르복실레이트-대-포스페이트 (C:P) 1.35 및 아민-대-포스페이트 비 0.85에서 강한 입자 안정성을 나타낸다. 고효율 1차 세포 트랜스펙션을 달성하는 것과 관련된 추가적인 일반 패턴, 공학 기술 제약, 관찰 및 실험 측정치에 대해서는, TCELL.001.2, TCELL.001.18 및 CYNOBM.002의 모든 제타 전위, 크기, 유동 세포 계측 및 현미경 데이터를 참조하면 된다 (예를 들어, 표 4 및 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조).

[0571] **도 53**은, TCELL.001.28 로부터의 데이터를 제공한다. **도 54**는, TCELL.001.29로부터의 데이터를 제공한다. **도 55**는, TCELL.001.31로부터의 데이터를 제공한다. **도 56**은, TCELL.001.33으로부터의 데이터를 제공한다. **도 57**은, TCELL.001.43으로부터의 데이터를 제공한다. **도 58**은, TCELL.001.44로부터의 데이터를 제공한다. **도**

59는, TCELL.001.46으로부터의 데이터를 제공한다. **도 60**은, TCELL.001.48로부터의 데이터를 제공한다. **도 61**은, TCELL.001.58로부터의 데이터를 제공한다. **도 62**는, TCELL.001.59로부터의 데이터를 제공한다.

[0572] **도 63 - 도 72**는, 시노몰구스 골수 세포에서 사용된 제형을 특징분석한 결과를 도시한다.

[0573] **도 63**은, CYNOBM.002.82로부터의 데이터를 제공한다. 입자는 생세포의 3%에서 태아 헤모글로빈 단백질 발현에 의해 입증된 바와 같이, 전체 골수 적혈구 전구 세포에서 BCL11a 적혈구 증강 인자를 성공적으로 결실시켰다. CYNOBM.002.82 나노입자는 2.96 +/- 0.14mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 132nm 미만의 직경을 가졌고, 입자의 50%는 30nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는, 유동 세포 계측 데이터에 따라 전체 골수 생존 가능한 하위집단을 단지 11.4%만 표적화함에도 불구하고, 생존 가능한 CD3+, CD45+ 및 CD34+ 골수 하위집단에서 각각, CRISPR RNP 및 Cy5 mRNA의 ~48%, ~53% 및 ~97% 효율의 CRISPR-GFP-RNP + Cy5_EGFP_mRNA 동시국소화된 흡수를 나타냈다.

[0574] 대조적으로, PLR10, PLE100, PDE100 및 Cas9 RNP로 이루어진 동일한 코어 템플릿을 포함하지만, PLR50의 mRNA 동시 전달 구성요소 또는 추가적인 층을 포함하지 않는 CYNOBM.002.75는, 생존 가능한 CD3+, CD45+ 및 CD34+ 골수 하위집단에서 각각, ~20%, ~14% 및 ~100% 효율의 CRISPR-GFP-RNP 흡수를 나타냈으며, 유동 세포 계측 데이터에 따라 전체 골수 생존 가능한 하위집단의 18.0%만 표적화하였다.

[0575] 이러한 데이터를 이용하여, 혼합된 골수 1차 집단 내 전체적인 트랜스펙션 효율에 있어서 약간의 향상이 나타난 경우, 입자가 보다 크면 선택적인 표적화에 보다 덜 부합할 수 있다고 추론될 수 있다. 1차 세포 배양 트랜스펙션에 대한 입자의 바이모달 분포의 영향이 결정되어야 한다. 이전 연구에서, 골아 세포는 150-200nm 입자를 고효율로 세포내이입하는 것으로 확인되었다. 놀랍게도, CYNOBM.002.82를 갖는 입자의 집단의 대부분은, PLE, PDE, mRNA 및 Cas9 RNP의 기저 폴리펩티드-리보핵단백질-mRNA-단백질 매트릭스를 둘러싸고 있는 PLR50의 양으로 하전된 양성 매트릭스를 갖는 TCELL.001.1과 유사하게도, 85nm 피크 미만이었다.

[0576] 추가적으로, 전체 생존 가능한 세포의 3.0%는 태아 헤모글로빈에 대하여 양성이었고, 이러한 세포 중 어느 것도 CD34+가 아니었으며, 이는 CD34- 적혈구 전구 세포 내 BCL11a 적혈구 전구체 녹아웃(knockout) 집단의 성공적인 클론 확장을 시사한다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 결과는 또한 내피 세포, 골아 세포, 파골 세포 및 골수의 다른 세포에서의 성공적인 표적화를 암시할 수 있다.

[0577] **도 64**는, CYNOBM.002.83으로부터의 데이터를 제공한다. 입자는 생세포의 1.9%에서 태아 헤모글로빈 단백질 발현에 의해 입증된 바와 같이, 전체 골수 적혈구 전구 세포에서 BCL11a 적혈구 증강 인자를 성공적으로 결실시켰으며, 이러한 세포 중 어느 것도 CD34+가 아니었다. 나노입자는 -2.47 +/- 0.33mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 206nm 미만의 직경을 가졌으며, 이는 동일한 IL2-모방물 펩티드 코팅을 갖는 CYNOBM.002.03에 비해 개선된 트랜스펙션 효율을 유도하였다. 약 -50 mV 및 +25 mV에서 테일을 갖는 큰 전하 분포는, CYNOBM.002.83과 유사하고, -18mV의 안정한 음이온성 단일 피크 제타 전위 및 다른 CRISPR + mRNA 동시-전달 입자 군(CYNOBM.002.82 - CYNOBM.002.85)과 비교하여 세포 생존력에 있어서 상응하는 증가를 갖는 CYNOBM.002.84와 대조적으로, 입자 안정성의 변화를 갖는 다분산 입자 집단을 나타낸다. 전체적인 시노몰구스 골수 동시-전달의 측면에서 그 다음으로 우수한 나노입자 군은, CYNOBM.002.86이었으며, 이는 -20mV의 유사하게 높게 순(net)-음으로 하전된 제타 전위 및 상응하는 고효율의 트랜스펙션, CD34 클론 확장 및 BCL11a 적혈구 증강 인자 녹아웃으로부터의 태아 헤모글로빈 생성으로 입증되었다. 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라, 전체 골수 생존 가능한 하위집단의 8.1%뿐 아니라, 혼합 세포 집단 내 생존 가능한 CD34+ 골수 세포에서 ~100% 효율의 CRISPR-GFP-RNP + Cy5_EGFP_mRNA 흡수를 나타냈다. 유동 세포 계측 데이터는 시노몰구스 골수 세포에서의 선택적인 CD34+ 증식의 도입을 나타내며, 이는 CD34- 적혈구 전구 세포 내 BCL11a 적혈구 전구체 녹아웃 집단의 성공적인 클론 확장을 시사한다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 결과는 또한 내피 세포, 골아 세포, 파골 세포 및 골수의 다른 세포에서의 성공적인 표적화를 암시한다.

[0578] **도 65**는, CYNOBM.002.84로부터의 데이터를 제공한다. 입자는 살아있는 전체 골수 세포의 9.5%에서 태아 헤모글로빈 단백질 발현에 의해 입증된 바와 같이, 전체 골수 적혈구 전구 세포에서 BCL11a 적혈구 증강 인자를 성공적으로 결실시켰으며, 각각의 선택적 하위집단에서 Cy5-mRNA+ 및 CRISPR-GFP-RNP+ 게이트에 의해 측정된 바와 같이 중간 정도의 트랜스펙션 효율에도 불구하고, CD34+, CD45 또는 CD3+ 하위집단에서 양성 태아 헤모글로빈 측정치가 없었다. CYNOBM.002.84 나노입자는 -18.07 +/- 0.71mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 205nm 미만의 직경을 가졌다. 높은 순-음성의 전하는 안정한 입자 형성을 나타낸다. 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라, 전체 골수 생존 가능한 하위집단의 25.5%뿐 아니라, 생존 가능한 CD3+, CD45+ 및 CD34+ 골수 세포에서 각각, 76.5%, 71% 및 ~100% 효율의 CRISPR-GFP-RNP + Cy5_EGFP_mRNA 흡수를 나타냈다. 추가적으로,

전체 생존 가능한 세포의 9.5%는 태아 헤모글로빈에 대하여 양성이었으며, 이러한 세포 중 어느 것도 CD34+가 아니었는데, 이는 CD34- 적혈구 전구 세포 내 BCL11a 적혈구 전구체 녹아웃 집단의 성공적인 클론 확장을 시사한다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 결과는 또한 내피 세포, 골아 세포, 파골 세포 및 골수의 다른 세포에서의 성공적인 표적화를 암시한다.

[0579] **도 66**는, CYNOBM.002.85로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 -12.54 +/- 0.25mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 186nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라, 생존 가능한 CD3+, CD45+ 및 CD34+ 골수 세포에서 각각, ~33%, ~23% 및 ~100% 효율의 CRISPR-GFP-RNP + Cy5_EGFP_mRNA 흡수를 나타냈다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 결과는 내피 세포, 골아 세포, 파골 세포 및 골수의 다른 세포에서의 성공적인 표적화를 암시할 수 있다. 입자 크기 및 전하 분포는 후속 CYNOBM.002 군 및 이의 예측된 시노몰구스 골수 CRISPR에서의 생물학적 성능 및/또는 mRNA 전달과 일치하였다.

[0580] **도 67**은, CYNOBM.002.86으로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 -20.02 +/- 0.10mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 120nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라, CD3+, CD45+ 및 CD34+ 를 각각 ~68%, 70% 및 ~97%의 효율로 표적화하였으며, 생존 가능한 시노몰구스 골수에서, 20.1% 효율의 CRISPR-GFP-RNP + Cy5_EGFP_mRNA의 동시 전달을 나타냈다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 결과는 내피 세포, 골아 세포, 파골 세포 및 골수의 다른 세포에서의 성공적인 표적화를 암시할 수 있다. 높게 음으로 하전된 제타 전위 및 입자 수의 90%가 <200nm인 것으로부터, 높은 효율이 예측된다.

[0581] **도 68**은, CYNOBM.002.76으로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 -12.02 +/- 0.59mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 135nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라, 생존 가능한 CD3+, CD45+ 및 CD34+ 골수 세포에서 각각, 18.4%, 10.3% 및 ~100% 효율의 CRISPR-GFP-RNP 흡수를 나타냈다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 추가적으로, ~500nm에서의 큰 체적 피크가 추가된 유사한 제타 전위 분포 및 크기를 나타내는 CYNOBM.002.78에서 볼 수 있는 바와 같이, 큰 응집체가 없는 25.8 - 80.6nm의 10번째 - 50번째 백분위 입자 크기를 갖고 높은 음성 제타 전위를 갖는 히스톤-모방물 입자로부터 예측된 바와 같이 제한된 독성을 나타낸다.

[0582] **도 69**는, CYNOBM.002.77로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자의 90%는 254nm 미만의 직경을 가졌고, 171 - 254nm 범위에서 큰 부분을 차지했다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 추가적으로, 갯수로 10번째 - 50번째 백분위 입자는 70 - 172nm였고, 이는 이러한 집단 내 합리적인 크기 분포를 나타낸다. >200nm인 다수의 입자가 용액에 존재하고/하거나 크고 분산된 제타 전위 및/또는 비음이온성 제타 전위를 갖는 경우의 다른 연구와 일치하게, 이러한 입자는 유의한 세포 사멸로 이어진다. 이러한 나노입자는 전체적으로 높은 흡수 백분율 나타내었으나, 다수의 세포 (>90%)가 사멸하였다. 궁극적으로, 입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라, 생존 가능한 CD3+, CD45+ 및 CD34+ 골수 세포에서 CRISPR-GFP-RNP의 검출 한계에서의 무시할 만한 흡수, 및 전체 골수 생존 가능한 하위집단 내에서 3.8%의 CRISPR 흡수를 나타냈다. 대조적으로, 동일한 표면 코팅을 갖는 CYNOBM.002.83 (CRISPR & mRNA 동시 전달 변형) 입자의 90%는 200nm 미만이었고, 수 평균은 121nm이었다. 유사한 제형을 갖는 TCELL.001.01 - TCELL.001.15에서의 입자와 상이한 방법을 통해 제조된, CYNOBM.002.75 - CYNOBM.002.81에서의 다른 입자는, 보다 유리한 크기 및 제타 전위 분포를 가졌고, 생존 가능한 인간 CD4+ 및 CD8a+ T-세포에서 높은 트랜스펙션 효율 (최대 99%)을 나타냈다.

[0583] **도 70**은, CYNOBM.002.78로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 -11.72 +/- 0.79mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 223nm 미만의 직경을 가졌다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 유사하게, 동일한 표면 코팅을 갖는 CYNOBM.002.84 (CRISPR & mRNA 동시 전달 변형) 입자의 90%는, CYNOBM.002.84의 제타 전위가 유의하게 보다 음성 (-18.07mV 대 -11.72mV)임에도 불구하고, 200nm 미만이었고, 수 평균은 125nm이었으며, 이는 PLR10을 이용한 초기 Cas9 RNP 전하 균질화, 및 리간드, 또는 추가적인 임의로 분자량이 일정하지 않은 중합체 또는 폴리펩티드로의 후속 코팅에 대한 음이온성 분리 가능 중간층 단계 중간체를 갖는 향상된 안정성을 나타낸다. 이러한 단일 전달 대 동시 전달 (또는 중간층 대 RNP에의 리간드의 직접적인 컨쥬게이션) 나노입자의 차별적인 물리화학적 특성 및 이의 각각의 크기 범위는, 트랜스펙션 효율 및 독성과 강한 상관관계가 있다.

[0584] **도 71**은, CYNOBM.002.79로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 200nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는 골수 전체에서 매우 낮은 (3.7%) GFP-RNP 흡수를 나타내었지만, 배양 중인 세포는 예외적인 생존력 (음성 대조군에 대하여 70.0% 대 71.6%)을 유지하였다. 매우 낮은 전반적 흡수에도 불구하고, 입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라, 생존 가능한 CD3+ 세포의 ~9.0%, 생존 가능한 CD45+ 세포의 4.4% 및 생존 가능한 CD34+ 세포의

~100% (이는 CD34+ 하위집단에서 세포수의 검출 한계에 있음)에 대하여 선택적인 흡수를 입증하였다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 결과는 혼합 세포 집단 내 CD34+ 조혈 줄기 세포의 특이적 표적화를 암시한다.

[0585] **도 72**는, CYNOBM.002.80으로부터의 데이터를 제공한다. 나노입자는 1.36 +/- 1.69mV의 제타 전위를 가졌다. 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라, 생존 가능한 CD34+ 골수 세포에서 ~100% 효율의 CRISPR-GFP-RNP 흡수 (이는 세포수의 검출 한계에 있음) 및 8% 트랜스펙션 효율을 나타냈다 (예를 들어, 하기 유동 세포 계측 및 이미지화 데이터 참조). 결과는 내피 세포, 골아 세포, 파골 세포 및 골수의 다른 세포에서의 성공적인 표적화를 암시할 수 있다. 넓은 표면을 갖는 ~0mV에서의 균일한 피크는, 쯔비터이온성(zwitterionic) 입자 표면을 나타낸다. 고도의 세포 생존력은, 입자가 이러한 크기로 잘 용인되며, c-Kit-수용체-유래 입자 표면이 세포-세포 상호작용 동안 골수 내 본래의 줄기 세포 집단 표면 마커의 제시를 모방할 가능성이 있다는 것을 나타낸다.

[0586] **도 73 - 도 109: 유동 세포 계측법 및 이미지화 데이터**

[0587] **도 73.** 시노몰구스 골수에서 CynoBM.002 샘플에 대한 비(非)트랜스펙션된 대조군.

[0588] 현미경 이미지 - 상단: 디지털 위상 대조; 중간: GFP; 하단: 병합. 유동 세포 계측법 데이터 - 생존력, CD34, CD3 및 CD45 염색 이용.

[0589] **도 74.** NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP의 리포펙타민 CRISPRMAX 전달은 생존 가능한 세포에서 2.5%의 트랜스펙션 효율을 달성하고, 유의한 독성을 야기하며, CD45 및 CD3 상대적 하위집단의 백분율은 시노몰구스 골수에서 음성 대조군과 비교하여 유의하게 감소되었다. 리포펙타민 CRISPRMAX는 남아있는 CD3+ 세포의 7.4% 효율의 표적화, 및 남아있는 CD45+ 및 CD34+ 세포 집단에서의 무시할 만한 표적화에 의해 예증된 바와 같이, 세포-선택성을 나타내지 않는다. 현미경 이미지 - 상단: 디지털 위상 대조; 중간: GFP; 하단: 병합.

[0590] **도 75.** CynoBM.002 RNP-Only 대조군은, NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP가 전달 벡터를 포함하지 않는 시노몰구스 골수에서 무시할 만한 트랜스펙션 효율을 달성하지만, 트랜스펙션 전 두 개의 페이로드가 사전 조합되었음을 나타낸다. 전달 벡터 및 최소한의 사건이 없음에도 불구하고 고도의 공편재화(colocalization)는, 리보핵단백질 복합체와 mRNA의 회합, 및 CRISPR RNP의 음이온성 관능화의 예를 나타낸다 (이러한 경우, mRNA는 RNP에 대한 느슨하게-연합된 분리 가능 코트로서 작용하며, 양이온성 물질로 추가로 적층될 수 있음). 공편재화 계수의 계산. X: 생세포에서 CRISPR 흡수%:

[0591] Y: 생세포에서 mRNA 흡수%

[0592] C: CRISPR 및 mRNA를 갖는 세포의 %

[0593] Z: X 또는 Y 중 큰 값

[0594] 공편재화 계수 = C/Z

[0595] Cas9-mRNA 공편재화 계수: 92.2%

[0596] **도 76.** CynoBM.002.82는, 비특이적으로-표적화된 NLS-Cas9-EGFP가 98.9%의 공편재화 계수를 갖는 시노몰구스 골수로 11.3% 효율의 mRNA 전달 및 11.4% 효율의 CRISPR 전달을 달성한다는 것을 입증하였다. 준세포 편재화는, 비특이적으로 표적화된 NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP가 Cy5 mRNA와 공편재화되고, 높은 트랜스펙션 효율을 달성한다는 것을 입증하였다. 고도의 공편재화는, 별개의 입자에 두 가지 페이로드가 로딩된다는 것을 밝힌다. 추가적으로, Cas9는 mRNA로부터의 별도의 구획에 정돈되게 편재화되어 있는 것으로 보이며, 여기서 mRNA는 핵-연합된 Cas9 주변에 고리형 구조를 형성한다. 이는, 2개의 페이로드의 세포질 (mRNA) 대 핵 (CRISPR) 편재화를 나타낸다. 현미경 이미지 - 상단: 디지털 위상 대조; 중간: Cy5 mRNA; 하단: 병합, 및 상단: Cas9-GFP RNP; 하단: Cas9-GFP RNP와 공편재화된 Cy5 mRNA.

[0597] 물리화학적 파라미터 및 추가적인 관찰에 대해서는 상기 데이터 참조.

[0598] CYNOBM.002.82는 2.96 +/- 0.14mV의 제타 전위를 가졌고, 이의 90%는 132nm 미만의 직경을 가졌으며, 입자의 50%는 30nm 미만의 직경을 가졌다. 이러한 나노입자는 전체 골수 생존 가능한 하위집단의 단지 11.4%만 표적화함에도 불구하고, 생존 가능한 CD3+, CD45+ 및 CD34+ 골수 하위집단에서 각각, 45.5%, 56.0% 및 97.3% 효율의 CRISPR-GFP-RNP + Cy5_EGFP_mRNA 흡수를 나타냈다. Cas9-mRNA 공편재화 계수: 94.8%. 생존 가능한 CD34+ 및 CRISPR+: 생존 가능한 CD34+의 97.2%. 태아 헤모글로빈 양성: 생존 가능한 세포의 3.022%.

[0599] **도 77.** CynoBM.002.83은, 93.0% 공편재화 계수를 갖는 시노몰구스 골수로 8.1% 효율의 mRNA 전달 및 8.1% 효율의 CRISPR 전달을 달성한다. 준세포 편재화는, NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP와 연합된 동종형으로-표적화된 IL2-유래 펩티드가 Cy5 mRNA와 공편재화되고, 높은 트랜스펙션 효율을 달성한다는 것을 입증하였다. 고도의 공편재화는, 별개의 입자에 두 가지 페이로드가 로딩된다는 것을 밝힌다. 추가적으로, Cas9는 mRNA로부터의 별도의 구획에 정돈되게 편재화되어 있는 것으로 보이며, 여기서 mRNA는 핵-연합된 Cas9 주변에 고리형 구조를 형성한다. 이는, 2개의 페이로드의 세포질 (mRNA) 대 핵 (CRISPR) 편재화를 나타낸다. 현미경 이미지 -상단: 디지털 위상 대조; 중간: Cy5 mRNA; 하단: 병합, 및 상단: Cas9-GFP RNP; 하단: Cas9-GFP RNP와 공편재화된 Cy5 mRNA.

[0600] 물리화학적 파라미터 및 추가적인 관찰에 대해서는 상기 데이터 참조.

[0601] 이러한 나노입자는, 생존 가능한 CD3+, CD45+ 및 CD34+ 골수 세포에서 각각, ~27%, 41% 및 ~100% 효율의 CRISPR-GFP-RNP + Cy5_EGFP_mRNA 흡수를 나타냈다. Cas9-mRNA 공편재화 계수: 93.0%. 태아 헤모글로빈 양성: 생존 가능한 세포의 1.9%.

[0602] **도 78.** CYNOBM.002.84 입자는 살아있는 전체 골수 세포의 9.5%에서 태아 헤모글로빈 단백질 발현에 의해 입증된 바와 같이, 전체 골수 적혈구 전구 세포에서 BCL11a 적혈구 증강 인자를 성공적으로 결실시키며, 각각의 선택적 하위집단에서 Cy5-mRNA+ 및 CRISPR-GFP-RNP+ 게이트에 의해 측정된 바와 같이 중간 정도의 트랜스펙션 효율에도 불구하고, CD34+, CD45 또는 CD3+ 하위집단에서 양성 태아 헤모글로빈 측정치를 갖지 않는다. 준세포 편재화는, NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP와 연합된 동종형으로-표적화된 E-셀렉틴-유래 펩티드가 Cy5 mRNA와 공편재화되고, 높은 트랜스펙션 효율을 달성한다는 것을 입증하였다. 고도의 공편재화는, 별개의 입자에 두 가지 페이로드가 로딩된다는 것을 밝힌다. 추가적으로, Cas9는 mRNA로부터의 별도의 구획에 정돈되게 편재화되어 있는 것으로 보이며, 여기서 mRNA는 핵-연합된 Cas9 주변에 고리형 구조를 형성한다. 이는, 2개의 페이로드의 세포질 (mRNA) 대 핵 (CRISPR) 편재화를 나타낸다. 현미경 이미지 - 상단: 디지털 위상 대조; 중간: Cy5 mRNA; 하단: 병합, 및 상단: Cas9-GFP RNP; 하단: Cas9-GFP RNP와 공편재화된 Cy5 mRNA.

[0603] 물리화학적 파라미터 및 추가적인 관찰에 대해서는 상기 데이터 참조.

[0604] 이러한 나노입자는 유동 세포 계측 데이터에 따라, 전체 골수 생존 가능한 하위집단의 ~25.5%뿐 아니라, 생존 가능한 CD3+, CD45+ 및 CD34+ 골수 세포에서 각각, 76.5%, 71% 및 ~100% 효율의 CRISPR-GFP-RNP + Cy5_EGFP_mRNA 공편재화된 흡수를 나타냈다. 추가적으로, 전체 생존 가능한 세포의 9.5%는 태아 헤모글로빈에 대하여 양성이었고, 이러한 세포 중 어느 것도 CD34+, CD3+ 또는 CD45+가 아니었으며, 이는 CD34- 적혈구 전구 세포 내 BCL11a 적혈구 전구체 녹아웃 집단의 성공적인 클론 확장을 시사한다. Cas9-mRNA 공편재화 계수: 97.1%. 태아 헤모글로빈 (HbF) 양성: 생존 가능한 세포의 9.5%.

[0605] 14% CD34+ 세포; CD34+ 및 HbF+의 0% 공편재화.

[0606] **도 79.** CynoBM.002.85는, 87.2% 공편재화 계수를 갖는 시노몰구스 골수로 5.2% 효율의 mRNA 전달 및 5.3% 효율의 CRISPR 전달을 달성한다. 생존 가능한 세포로의 5.3% 효율의 CRISPR 전달에도 불구하고, CynoBM.002.85는 다른 동시 전달 구현예에서 볼 수 있는 바와 같이, 태아 헤모글로빈 양성 세포에서 수반되는 증가를 유도하지 않는다. 준세포 편재화는 NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP와 연합된 동종형으로-표적화된 SCF-유래 펩티드가 Cy5 mRNA와 공편재화되고, 높은 트랜스펙션 효율을 달성한다는 것을 입증하였다. 고도의 공편재화는, 별개의 입자에 두 가지 페이로드가 로딩된다는 것을 밝힌다. 추가적으로, Cas9는 mRNA로부터의 별도의 구획에 정돈되게 편재화되어 있는 것으로 보이며, 여기서 mRNA는 핵-연합된 Cas9 주변에 고리형 구조를 형성한다. 이는, 2개의 페이로드의 세포질 (mRNA) 대 핵 (CRISPR) 편재화를 나타낸다. 현미경 이미지 - 상단: 디지털 위상 대조; 중간: Cy5 mRNA; 하단: 병합, 및 상단: Cas9-GFP RNP; 하단: Cas9-GFP RNP와 공편재화된 Cy5 mRNA.

[0607] 추가적인 물리화학적 특징에 대해서는 상기 데이터 참조. 이러한 나노입자는 생존 가능한 CD3+, CD45+ 및 CD34+ 골수 세포에서 각각, ~33%, ~23% 및 ~100% 효율의 CRISPR-GFP-RNP + Cy5_EGFP_mRNA 흡수를 나타냈다. Cas9-mRNA 공편재화 계수: 87.2%. 태아 헤모글로빈 양성: 생존 가능한 세포의 0.9%.

[0608] **도 80.** CynoBM.002.86은, 98.6%의 공편재화 계수를 갖는 시노몰구스 골수로 20.1% 효율의 mRNA 전달 및 21.8% 효율의 CRISPR 전달을 달성한다. 준세포 편재화는, 이형3가로(heterotrivalently)-표적화된 IL2-, E-셀렉틴- 및 SCF-유래 NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP가 Cy5 mRNA와 공편재화되고, 높은 트랜스펙션 효율을 달성한다는 것을 입증하였다. 고도의 공편재화는, 별개의 입자에 두 가지 페이로드가 로딩된다는 것을 밝힌다. 추가적으로, Cas9는 mRNA로부터의 별도의 구획에 정돈되게 편재화되어 있는 것으로 보이며, 여기서 mRNA는 핵-연합된

Cas9 주변에 고리형 구조를 형성한다. 이는, 2개의 페이로드의 세포질 (mRNA) 대 핵 (CRISPR) 편재화를 나타낸다. 현미경 이미지 -상단: 디지털 위상 대조; 중간: Cy5 mRNA; 하단: 병합, 및 상단: Cas9-GFP RNP; 하단: Cas9-GFP RNP와 공편재화된 Cy5 mRNA.

[0609] 추가적인 물리화학적 특징에 대해서는 상기 데이터 참조. Cas9-mRNA 공편재화 계수: 91.3%. 태아 헤모글로빈 양성: 생존 가능한 세포의 7.6%.

[0610] **도 81.** CynoBM.002.75는, 분리 가능 음이온성 폴리펩티드 코트를 갖는 비특이적으로-표적화된 NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP가, 생존 가능한 시노몰구스 골수에서 18.0%의 트랜스펙션 효율을 달성한다는 것을 입증하였다. 전체적으로, 생존 가능한 CD3+ T-세포의 20%는 본원의 혼합 집단 시노몰구스 골수 배양 모델에서 CRISPR+였으며, 대조적으로 인간 1차 Pan T-세포에서 생존 가능한 CD4 및 CD8a T-세포의 97-99%는 TCELL.001에서 CRISPR+였다. 동일한 제형의 입자 크기는 TCELL1에서 보다 작고 보다 균일하였으며, 이는 수동식이 아닌 유체 취급용 로봇을 통해 합성되었다. 추가적인 정성적 및 정량적 해설 및 데이터 비교에 대해서는 상기 데이터 참조. 상단: 디지털 위상 대조; 중간: GFP; 하단: 병합.

[0611] **도 82.** CynoBM.002.76은, 이중-히스톤-단편-연합 및 비특이적으로-표적화된 NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP가, 13.1%의 트랜스펙션 효율 및 시노몰구스 골수에서 음성 대조군에 비해 제한된 독성을 달성한다는 것을 입증하였다. CD3+, CD45+ 및 CD34+ 생존 가능한 하위집단의 18%, 10% 및 0%는 CRISPR+였다. 추가적인 물리화학적 특징 및 관찰에 대해서는 상기 데이터 참조. 상단: 디지털 위상 대조; 중간: GFP; 하단: 병합.

[0612] **도 83.** CynoBM.002.77은, NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP와 연합된 동종형으로-표적화된 IL2-유래 펩티드가, 3.8%의 트랜스펙션 효율 및 시노몰구스 골수에서 음성 대조군에 비해 증강된 생존력을 달성한다는 것을 입증하였다. 트랜스펙션된 세포의 ~90%는 사멸했다. 궁극적으로, 입자는 생존 가능한 CD3+, CD45+ 및 CD34+ 골수 세포에서, CRISPR-GFP-RNP의 검출 한계에서 무시할 만한 흡수를 나타내었으며, 이는 살아있는 CRISPR+ 세포의 남아있는 3.8%가 하위집단으로부터의 것이 아니라는 것을 나타낸다. 크기 데이터는 큰 입자 다분산도 및 ~999nm의 90번째 부피 백분위 입자 크기에서 독성의 원인적 역할을 지지한다. 추가적인 물리화학적 특성에 대해서는 상기 데이터 참조. 상단: 디지털 위상 대조; 중간: GFP; 하단: 병합.

[0613] **도 84.** CynoBM.002.78은, NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP와 연합된 동종형으로-표적화된 E-셀렉틴-유래 펩티드가 ~71% 전반적 트랜스펙션 효율 (사멸한 세포 포함)을 달성하고, 생세포의 단지 4.5%만 시노몰구스 골수에서 트랜스펙션된 채로 남아있다는 것을 입증하였다. 이는 입자 독성을 나타내며, 이는 갯수로 입자의 50%가 33.1 - 113.1nm임에도 불구하고 큰 크기 분포와 상관관계가 있을 수 있다. 용액에서 대부분의 입자 질량 및 부피를 포함하는 >250nm의 입자는, 이러한 실험의 생존력을 감소시킬 수 있다. CD45+ 및 CD3+ 하위집단 밀도는 마찬가지로 이러한 구현예에서 다방면으로 감소하였다. 동일한 트랜스펙션으로부터의 나노입자 군과 비교한, 보다 상세한 물리화학적 특징 및 정성적 관찰에 대해서는 상기 데이터 참조.

[0614] 상단: 디지털 위상 대조; 중간: GFP; 하단: 병합.

[0615] **도 85.** CynoBM.002.79는, NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP와 연합된 동종형으로-표적화된 SCF-유래 펩티드가, 3.7%의 트랜스펙션 효율 및 시노몰구스 골수에서 음성 대조군에 비해 탁월한 생존력을 달성한다는 것을 입증하였다.

[0616] 이러한 나노입자는 전체 골수에서 매우 낮은 (3.7%) GFP-RNP 흡수를 나타내었지만, 배양 중인 세포는 예외적인 생존력 (음성 대조군에 대하여 69.0% 대 71.6%)을 유지하였다. 매우 낮은 전반적 흡수에도 불구하고, 입자는 생존 가능한 CD3+ 세포의 ~5%, 생존 가능한 CD45+ 세포의 ~4% 및 생존 가능한 CD34+ 세포의 ~100% (이는 숫자로 검출 한계에 있음)에 대한 선택적인 흡수를 입증하였다. 강한 음성 제타 전위 및 다른 군에 비해 유의하게 더 많은 CD45+ 세포와 결합된 고도의 세포 생존력은, 줄기 세포 틈새 표적화, 및 증식 및/또는 생존 기술을 확립하는데 있어서의 SCF-모방물 입자 표면의 다원적 역할을 암시한다. 추가적인 물리화학적 파라미터에 대해서는 상기 데이터 참조.

[0617] 상단: 디지털 위상 대조; 중간: GFP; 하단: 병합.

[0618] **도 86.** CynoBM.002.80은, NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP와 연합된 동종형으로-표적화된 c-Kit-(CD117)-유래 펩티드가 8.097%의 트랜스펙션 효율을 달성한다는 것을 입증하였다. 트랜스펙션 효율은 3.3%, 2.4% 였고, 각각 CD3+, CD45+ 및 CD34+ 생존 가능한 하위집단에 대한 검출 한계에 있었으며, 이는 CD3+ 및 CD45+ 세포에 대한 낮은 선택성을 나타낸다. 추가의 정량적 및 정성적 데이터에 대해서는 상기 데이터 참조.

[0619] 상단: 디지털 위상 대조; 중간: GFP; 하단: 병합. (계속): 유동 세포 계측 데이터.

[0620] **도 87.** CynoBM.002.81은, 이형3가로-표적화된 IL2-, E-셀렉틴- 및 SCF-유래 NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP가 시노몰구스 골수에서 5%의 트랜스펙션 효율을 달성하고, 세포의 단지 0.48%만 CD34+임에도 불구하고, 트랜스펙션된 세포의 ~10%가 살아있는 CD34+ 세포라는 것을 입증하였다. 이는 CD34+ 세포의 거의 100% 효율의 선택적 트랜스펙션을 나타낸다. 상단: 디지털 위상 대조; 중간: GFP; 하단: 병합.

[0621] **도 88.** CynoBM.002 RNP-Only 대조군의 정성적 이미지는, NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP가 전달 벡터를 포함하지 않는 시노몰구스 골수에서 온건한 양성 신호를 달성한다는 것을 보여준다. 상단: 디지털 위상 대조; 중간: GFP; 하단: 병합.

[0622] **도 89.** HSC.004 (나노입자 69-74, 표 4 참조) 고함량 스크리닝. 1차 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포에서, 트랜스펙션 12-15시간 후, HSC.004 Cy5 mRNA 전달의 형광 현미경 이미지 (Cy5 mRNA). mRNA 제형의 이러한 특정 구현예에서, SCF 펩티드 및 E-셀렉틴으로의 이형2가 표적화뿐 아니라, SCF 펩티드가 아닌 E-셀렉틴으로의 동종형 표적화는, 리포펙타민 MessengerMAX보다 높은 트랜스펙션 효율을 달성한다. HSC.001.69: A1 - A6; HSC.001.70: B1 - B6; HSC.001.71: C1 - C6; HSC.001.72: D1 - D6; HSC.001.73: E1 - E6; HSC.001.74: F1 - F6; HSC.004 리포펙타민 MessengerMAX 투여량 1: G1 - G2 & G4 - G5; TC.001 리포펙타민 MessengerMAX 투여량 2: H1 - H2 & H4 - H5; TC.001 음성: G3, G6, H3, H6.

[0623] **도 90.** TCELL.001 (나노입자 1-15, 표 4 참조) 고함량 스크리닝. 로봇식 배합을 TC.001.1 - TC.001.60에 대하여 수행하여, 4개의 페이로드 (CRISPR RNP, mRNA, siRNA 및 pDNA)에 걸쳐 15개의 리간드를 제시하였다. T-세포 CRISPR 전달 및 정성적 트랜스펙션 효율의 구현예가 제시된다 - 1차 인간 Pan T-세포로의 TCELL.001 CRISPR-EGFP RNP 전달의, 트랜스펙션 12-15시간 후 복합 현미경의 엄지손톱 이미지.

[0624] 플레이트 레이아웃 : TC.001.1: A1 - C1; TC.001.3: D1 - F1; TC.001.4: A2 - C2; TC.001.5: D2 - F2; TC.001.6: A3 - C3; TC.001.7: D3 - F3; TC.001.8: A4 - C4; TC.001.9: D4 - F4; TC.001.10: A5 - C5; TC.001.11: D5 - F5; TC.001.12: A6 - C6; TC.001.13: D6 - F6; TC.001.14: A7 - A9; TC.001.15: B7 - B9 ; TC.001.2: A10 - A12; TC.001 리포펙타민 CRISPRMAX 투여량 1: B10 - B12; TC.001 리포펙타민 CRISPRMAX 투여량 2: C7 - C9; TC.001 RNP 만: C10 - C12; TC.001 음성: D7 - E12.

[0625] **도 91.** TCELL.001 리포펙타민 CRISPRMAX. 리포펙타민 CRISPRMAX는 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 4.7% 및 4.8% 효율의 NLS-Cas9-EGFP RNP의 전달을 달성하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 12.5% 및 전체 세포의 65.9%가 생존 가능하였다.

[0626] **도 92:** TCELL.001.1은, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 99.163% 효율 및 98.447% 효율의 비특이적으로-표적화된 CRISPR-GFP 리보핵단백질 흡수를 나타냈다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 60.2% 및 전체 세포의 57.2%가 생존 가능하였다.

[0627] **도 93.** TCELL.001.2, 비특이적으로-표적화된 PEG화 대조군은, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 5.5% 효율 및 6.9% 효율의 CRISPR-GFP 리보핵단백질 흡수를 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 5.6% 및 전체 세포의 40.5%가 생존 가능하였다.

[0628] **도 94.** TCELL.001.3은, CRISPR-GFP 리보핵단백질과 연합된 동종형으로-표적화된 시알로어드헤신-유래 펩티드가, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 11.6% 및 13.2% 효율의 흡수를 생성한다는 것을 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 40.0% 및 전체 세포의 79.2%가 생존 가능하였다.

[0629] **도 95.** TCELL.001.4는, CRISPR-GFP 리보핵단백질과 연합된 동종형으로-표적화된 CD80-유래 펩티드가, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 6.8% 및 8.8% 효율의 흡수를 생성한다는 것을 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 12.9% 및 전체 세포의 60.2%가 생존 가능하였다.

[0630] **도 96.** TCELL.001.5는, CRISPR-GFP 리보핵단백질과 연합된 동종형으로-표적화된 CD80-유래 펩티드가, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 10.3% 및 10.9% 효율의 CRISPR-GFP 리보핵단백질 흡수를 생성한다는 것을 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 48.3% 및 전체 세포의 85.1%가 생존 가능하였다. 9개 웰의 음성 대조군 (TCELL.001 유동 세포 계측법의 경우, n=3 음성)에 걸쳐, 생존률은 81.4%, 84.7% 및 82.5%였으며, 이는 C-말단 앵커링된, CD80-유래 CD28-표적화 펩티드가, 배양 용

액에서 비트랜스펙션된 세포에 대한 온건한 생존-촉진 효과를 가질 수 있다는 것을 입증한다는 점에 유의한다. 대조적으로, TCELL.001.4, 동일한 N-말단 앵커링된 펩티드는, 또한 CD28 막관통 수용체에 대하여 상이한 알로스테릭 현상을 갖는 CD80-유래 단편인, TC.001.6 및 TC.001.7에서와 같이, 뚜렷한 독성을 나타냈다.

[0631] **도 97.** TCELL.001.6은, CRISPR-GFP 리보핵단백질과 연합된 동종형으로-표적화된 CD86-유래 펩티드가, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 1.7% 및 2.9% 효율의 흡수를 생성한다는 것을 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 6.8% 및 전체 세포의 69.1%가 세포 생존 가능하였다.

[0632] **도 98.** TCELL.001.7은, CRISPR-GFP 리보핵단백질과 연합된 동종형으로-표적화된 CD86-유래 펩티드가, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 1.6% 및 2.1% 효율의 흡수를 생성한다는 것을 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 10.3% 및 전체 세포의 76.4%가 생존 가능하였다.

[0633] **도 99.** TCELL.001.8은, CRISPR-GFP 리보핵단백질과 연합된 동종형으로-표적화된 CD86-유래 펩티드가, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 14.5% 및 16.0% 효율의 흡수를 생성한다는 것을 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 39.1% 및 전체 세포의 76.3%가 생존 가능하였다.

[0634] **도 100.** TCELL.001.9는, CRISPR-GFP 리보핵단백질과 연합된 동종형으로-표적화된 4-1BB-유래 펩티드가, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 3.6% 및 3.2% 효율의 흡수를 생성한다는 것을 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 27.5% 및 전체 세포의 87.8%가 생존 가능하였다. 9개 웰의 음성 대조군 (TCELL.001 유동 세포 계측법의 경우, n=3 음성)에 걸쳐, 생존률은 81.4%, 84.7% 및 82.5%였으며, 이는 C-말단 앵커링된, 4-1BB-유래 CD137-표적화 펩티드가, 배양 용액에서 비트랜스펙션된 세포에 대한 온건한 생존-촉진 효과를 갖는다는 것을 입증한다는 점에 유의한다.

[0635] **도 101.** TCELL.001.10은, CRISPR-GFP 리보핵단백질과 연합된 동종형으로-표적화된 4-1BB-유래 펩티드가, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 5.8% 및 5.4% 효율의 흡수를 생성한다는 것을 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 30.8% 및 전체 세포의 84.2%가 생존 가능하였다. 9개 웰의 음성 대조군 (TCELL.001 유동 세포 계측법의 경우, n=3 음성)에 걸쳐, 생존률은 81.4%, 84.7% 및 82.5%였으며, 이는 T -세포와 함께 고유의 생존 신호전달을 갖는 C-말단 앵커링된, 4-1BB-유래 CD137-표적화 펩티드가, 배양 용액에서 전반적인 독성을 나타내지 않음을 입증한다.

[0636] **도 102.** TCELL.001.11은, CRISPR-GFP 리보핵단백질과 연합된 동종형으로-표적화된 CD3-Ab-유래 펩티드가, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 12.9% 및 12.4% 효율의 흡수를 생성한다는 것을 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 50.0% 및 전체 세포의 77.6%가 생존 가능하였다.

[0637] **도 103.** TCELL.001.12는, CRISPR-GFP 리보핵단백질과 연합된 동종형으로-표적화된 CD3-Ab-유래 펩티드가, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 9.0% 및 9.5% 효율의 흡수를 생성한다는 것을 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 38.9% 및 전체 세포의 80.7%가 생존 가능하였다.

[0638] **도 104.** TCELL.001.13은, CRISPR-GFP 리보핵단백질과 연합된 동종형으로-표적화된 IL2-유래 펩티드가, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 25.7% 및 28.6% 효율의 흡수를 생성한다는 것을 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 40.3% 및 전체 세포의 68.1%가 생존 가능하였다.

[0639] **도 105.** TCELL.001.14는, CRISPR-GFP 리보핵단백질과 연합된 동종형으로-표적화된 IL2-유래 펩티드가, 트랜스펙션 24시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD4+ 및 CD8a+ 하위집단에서 각각, 24.9% 및 25.8% 효율의 흡수를 생성한다는 것을 입증하였다. 전반적으로, CRISPR+ 세포의 45.9% 및 전체 세포의 70.1%가 생존 가능하였다.

[0640] **도 106.** TCELL.001.15, 12가로-표적화된 12-리간드 변형은, 세포내이입 흡수 또는 CRISPR 전달을 유도하지 않는다. 전반적으로, 전체 세포의 59.8%가 생존 가능하였다.

[0641] **도 107.** TCELL.001 음성 대조군. 9개 웰의 음성 (비트랜스펙션된) 대조군 중 하나로부터의 대표적인 결과. 전

반적으로, 세포 씨딩 52시간 후 (트랜스펙션 24시간 후), 전체 세포의 81.4%, 84.7% 및 82.5%가 생존 가능하였다.

[0642] **도 108.** BLOOD.002는, 글리코실화된 세포 표면 마커 표적화를 위한 SIGLEC 유도체의 사용을 통해 전체 인간 혈액의 림프구 게이트에서 60% - 97%의 mRNA 전달 효율을 달성하며; Attune NxT 유동 세포 측정기를 통해 검정된 Cy5-태깅된 EGFP mRNA가 제시되어 있다. 리간드 표적화는 PEG화 대조군에 비해 세포 신호의 유의한 증강제이다. 나노입자 거동을 예측하는 추가적인 물리화학적 특성에 대해서는 상기 데이터 참조. Blood.002 대조군: 비트랜스펙션됨. Blood.002.88: CD45- 및 Neu5Ac-표적화 SIGLEC 유도체 (음이온성 중합체 전 첨가된 양이온성 앵커-링커-리간드 펩티드). Blood.002.89: CD45- 및 Neu5Ac-표적화 SIGLEC 유도체 (음이온성 중합체 후 첨가된 양이온성 앵커-링커-리간드 펩티드). Blood.002.90: PEG화 대조군 (음이온성 중합체 전 첨가된 양이온성 앵커-PEG). Blood.002.91: 비특이적으로-표적화된 변형. Blood.002.92: 페이로드를 포함하지 않는 CD45- 및 Neu5Ac-표적화 SIGLEC 유도체 (앵커-링커-리간드는 음성 형광 대조군인 음이온성 중합체에 직접 컨쥬게이션됨).

[0643] **도 109.** TCELL.001.27은, 유동 세포 계측법을 통해 측정된 바와 같이, 동종형으로-표적화된 SIGLEC-유래 펩티드가, 트랜스펙션 5시간 후에, 인간 1차 Pan T-세포의 생존 가능한 CD8a+ 및 CD4+ 하위집단에서, 45% 효율의 Cy5 mRNA 흡수를 유도한다는 것을 입증하였다. 이러한 입자의 크기 및 제타 전위는 171nm의 평균 입자 크기 및 -25.5 +/- 0.15 mV의 제타 전위를 입증하였으며, 이는 폴리(글루탐산)이 양이온성 앵커-링커-리간드의 내포 후에 첨가되는 경우, 카르복실레이트-대- 포스페이트 (C:P) 1.35 및 아민-대- 포스페이트 비 0.85에서 강한 입자 안정성을 나타낸다. 제타 전위 및 크기 데이터에 대해서는 상기 데이터 참조 (TCELL.001.2 및 TCELL.001.18). 추가적인 정량적 세부사항에 대해서는 상기 데이터 참조. 상단-우측: 명시야; 중간-우측: Cy5 mRNA; 하단-우측: 합병, 상단: 음성 대조군의 명시야; 하단: 음성 대조군의 Cy5 채널.

[0644] 실시예 4

[0645] **도 110.** 리보핵단백질 및 단백질 전달에 대한 근거. CRISPR RNP의 전하 밀도 플롯은, 음이온성 또는 양이온성 펩티드/물질이 단백질 표면 상에 안정한 하전된 층을 형성하기 위해 첨가되어야 하는 지를 결정하는 것을 가능하게 한다. 하나의 구현예에서, 노출된 핵산 (음이온성) 및 음이온성 전하 포켓은 하전된 음이온의 첨가 전 하전된 양이온에 대한 강한 정전기적 앵커링 부위로서, 또는 그 자체의 리간드-링커 음이온성 앵커로서 작용한다. 스케일 바: 전하.

[0646] **도 111.** 리보핵단백질 및 단백질 전달에 대한 근거. 슬리핑 뷰티 트랜스포존의 전하 밀도 플롯은, 음이온성 또는 양이온성 펩티드/물질이 단백질 표면 상에 안정한 하전된 층을 형성하기 위해 첨가되어야 하는 지를 결정하는 것을 가능하게 한다. 또 다른 구현예에서, 양이온성 전하 포켓은 하전된 음이온에 대한 강한 정전기적 앵커링 부위로서, 그 자체의 리간드-링커-음이온성 앵커 도메인으로서 또는 하전된 양이온의 첨가 전에 작용한다. 스케일 바: 전하.

[0647] **도 112.** (1) CRISPR RNP 표면 상의 양이온성 부위에 앵커링하는 예시적인 음이온성 펩티드 (9-10개의 아미노산 길이, 약 10nm 직경 CRISPR RNP까지 조정), 이후 (2) (2a) 앵커-링커-리간드 또는 독립형 양이온성 앵커로서, (2b) 후속 다층화 화학, 다수의 핵산 또는 하전된 치료제의 동시 전달, 또는 가교 결합을 통한 층 안정화의 부가 유무에 관계없이, 양이온성 앵커의 첨가.

[0648] 도면에서 좌측에서 우측으로 텍스트로 전환된 필기된 것: '양이온성 앵커'. '스페이서'. '리간드'. '및/또는'. '2d'. '양이온성 중합체 및/또는 폴리펩티드'. '2b. 뒤이어 중간층 화학'.

[0649] **도 113.** 하전된 단백질 코어 템플릿을 이용한 페이로드 동시 전달에 대한 근거. Cas9 RNP, 또는 임의의 동종으로 또는 쯔비터이온성으로 하전된 표면을 포함할 수 있는, 코어 템플릿을 기반으로 하는 정전기적 매트릭스 조성물 및 첨가 순서의 예. 다양한 중합체를 이용하여 쯔비터이온성 표면의 전하를 균질화하는 방법이 제시된다. gRNA에 결합된 CRISPR-Cas9 RNP로 이루어진 ~10nm 코어 입자가 쯔비터이온성 도메인과 함께 제시된다. 간략하게, 양이온성 중합체 또는 음이온성 중합체가 반대로 하전된 중합체의 첨가 전 표면 전하를 균질화 하기 위해 첨가될 수 있다. 음이온성 구성 성분의 일정하지 않은 분자량은, CYNOBM.002.75 - CYNOBM.002.81에서의 단일 페이로드 전달 변형에 비해, CYNOBM.002.82 - CYNOBM.002-86에서의 다양한 표면 코팅을 갖는 mRNA-PLE 중간층 및 RNP 코어를 포함하는 입자의 트랜스펙션 효율 및 유전자 편집 효율을 증가시키는 것으로 입증된다. 하전된 코어 템플릿 구현예는, 하전된 덴드리머 또는 올리고당-덴드리머, 재조합 또는 합성 히스톤 이량체/삼량체/사량체/팔량체, 나노다이아몬드, 금 나노입자, 양자점, MRI 조영제 또는 상기 언급된 것들의 조합을 포함하는 임의

의 하전된 표면을 포함한다.

[0650] 도면에서 좌측에서 우측으로 텍스트로 전환된 필기된 것: '음으로 하전된 코팅은 양이온성 중합체 또는 앵커-링커-리간드에 의해 적층될 수 있으며, 여기서 앵커는 양이온성임.' '아미노 당'. '하전된 글리코사미노글리칸'. 'pDNA'. '동시 전달'. '노출된 gRNA'. '순 음성의 분리 가능 중합체 코트'. '글리칸'. 'cas9 상의 양이온성 단백질 도메인'. '~10nm cas9 RNP'. 'cas9 상의 양이온성 단백질 도메인'. 'PLR'. 'PDE (5-100)'. 'PLE(5-100)'. 'cas9 상의 음이온성 단백질 도메인'. 'mRNA'. '글리코펩티드 상의 분지형 양이온성 중합체'. '히스톤'. 'siRNA'. '음으로 하전된 코팅은 또한 음이온성 앵커-링커-리간드 또는 독립형 음이온성 매트릭스 조성물의 도메인일 수 있음'. '일관된 중합체의 일정하지 않은 mw는 콜로이드 안정성 및 유전자 편집 효율을 증가시킴'.

[0651] 실시예 5

[0652] **도 114. 펩티드 공학 기술 - IL2R 표적화를 위한 신규한 IL2-모방물 단편.** 인터류킨-2 수용체 (우측)에 결합된 인터류킨-2 (좌측) (PDB: 1Z92)

[0653] 서열 ASN(33)-PRO(34)-LYS(35)-LEU(36)-THR(37)-ARG(38)-MET(39)-LEU(40)-THR(41)-PHE(42)-LYS(43)-PHE(44)-TYR(45) (서열 번호 173)은, IL2 수용체 알파 사슬에 대한 활성 결합의 영역과 상관관계가 있는 IL2 (PDB 1Z92)로부터 선택된다. IL2R과 IL2의 상호작용 모티프의 선택을 통한 상보적 결합의 공학 기술: 여기서, 서열 CYS(3)-ASP(4)-ASP(5)-ASP(6)-MET(25)-LEU(26)-ASN(27)-CYS(28)-GLU(29) (서열 번호 184)는, IL2 수용체로부터의 2개의 결합 모티프에 대하여 선택된다.

[0654] **도 115:** 펩티드 공학 기술 - CD3을 이용한 신규한 항체-유래 "활성 결합 포켓" 공학 기술의 개념 증명. 서열 THR(30)-GLY(31)-ASN(52)-PRO(53)-TYR(54)-LYS(55)-GLY(56)-VAL(57)-SER(58)-THR(59)-TYR(101)-TYR(102)-GLY(103)-ASP(104) (서열 번호 185)는, CD3 엡실론 및 델타 사슬에 대한 활성 결합의 영역과 상관관계가 있는 CD3 항체 (PDB 1XIW)로부터 선택된다. 아미노산의 순서는, 보다 큰 단백질에 의해 유지되는 3차원 구조를 더 이상 갖지 않는 결합 포켓에서 펩티드의 2-차원 평면의 결합 동력학을 반영하기 위해 재배열된다. 이러한 치수 감소는 하기를 유도한다: THR(59)-SER(58)-VAL(57)-GLY(56)-LYS(55)-TYR(54)-PRO(53)-ASN(52)-THR(30)-GLY(31)-TYR(101)-TYR(102)-GLY(103)-ASP(104) (서열 번호 174).

[0655] **도 116**: 펩티드 공학 기술 - CD45 글리코실화 표적화를 위한 신규한 SIGLEC 유도체. N-아세틸뉴라민산 (Neu5Ac) (RCS PDB 1ODA)과의 복합체에서 시알로어드헤신 N-말단의 PDB 렌더링. 렌더링에서 시알로어드헤신에 인접한 시알로어드헤신 단편을 글리코실화된 CD45 및 다른 복합체 세포-표면 당단백질을 표적화하는데 이용하였다. 이는 TCELL.001.3에서 CRISPR RNP를 갖는 T-세포뿐 아니라, BLOOD.002.1 - BLOOD.002.2에서 전혈 림프구 게이트 내 mRNA의 성공적인 표적화를 생성한다. 리간드에 대한 서열은 SNRWLDVK (서열 번호 172)이다.

[0656] **도 117**: 펩티드 공학 기술 - c-Kit 표적화를 위한 신규한 SCF 단편. 점선 원 - 줄기 세포 인자 (RCS PDB 1SCF)의 신호 펩티드 도메인은 c-Kit 활성에 필요한 이량체 도메인을 나타낸다. 특정한 나노입자 표면 크기 + SCF 코팅 밀도로 인한 세포 흡수에 대한 리간드 제시의 영향은, CynoBM.002.79 (~5% 효율)와 CynoBM.002.85 (~56% 효율) 사이에서 비교되고 대조될 수 있다. 추가적으로, 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 트랜스펙션의 정성적 이미지의 대조가 제시되며, 여기서 E-셀렉틴 + SCF 단편 (HSC.004.73)은 높은 효율을 달성하지만, SCF 단편 그 자체만으로는 달성하지 못한다 (HSC.004.74). 거동에 있어서의 현저한 차이는, 핵산 및/또는 리보핵단백질 물질의 세포내이입 단서 및 후속 핵 표적화를 생성하는데 있어서의 이량체 펩티드의 특정한 역할을 시사한다. 리간드에 대한 서열은 EKFILKVRPAFKAV (서열 번호 175) (mSCF/rmSCF)이다.

[0657] **도 118:** 펩티드 공학 기술 - 막-결합된 SCF 표적화를 위한 신규한 cKit 수용체 단편. 내피 및 골수 세포에 대한 조혈 줄기 세포 롤링 거동의 거동을 모방하고, 전신 트랜스펙션 효율을 증가시키기 위한, c-Kit로부터 유도된 줄기 세포 인자 표적화 펩티드의 합리적 설계 (CynoBM.002.80 참조). 접힘(folding)에 대하여 평가된 서열: 명칭 SCFN, 서열: RRRRRRRRRGGGGSGGGGSEGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPK (서열 번호 186). 서열을 Rosetta 및 NAMD 시뮬레이션 패키지로 평가하였다 -Rosetta 결과: 단축된 서열이 최초의 접힘을 위해 Rosetta에 배치됨 (GGSEGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPK)(서열 번호 186의 잔기 17-43).

[0658] **도 119:** 펩티드 공학 기술 - cKit 수용체 단편 (계속). 나노입자 표면 상에 제시될 수 있는 것처럼 엔트로피적으로 유리한 입체구조를 시뮬레이션하는 것을 가능하게 위해 고정된 앵커-링커-리간드의 앵커 분절을 이용한 분자 역학 시뮬레이션. 각각의 결과는, 이러한 구조 중 어느 것이 바람직할 수 있다는 것을 결정하기 곤란하다는 것을 의미하는, 동일한 채점 인자를 함유한다. 또한, Rosetta는 접힘 동역학을 수행하지 않기 때문에, 이러한

서열이 나선형 구조로 접혀지지 않을 가능성이 높다.

[0659] NAMD 결과: Rosetta가 접힘 동역학을 수행하지 않기 때문에, 이는 전체 서열이 2차 구조로 빠르게 접혀지는지 여부를 점검하였다. 시뮬레이션을 300-500 K에서 16 또는 32개의 복제품에 대하여 복제품 교환 분자 동역학 (replica exchange molecular dynamics (REMD))을 사용하여 NAMD에서 수행하고, 각각의 복제품에 대하여 10ns로 시뮬레이션하였다. 앵커 섹션 (poly-R)을 입자에 결합된 단백질을 시뮬레이션하기 위해 선형으로 고정시켰다. 가장 낮은 에너지 스냅샷이 제시된다.

[0660] KIT로부터 유도된 서열의 추가 분석은, 그것이 다수의 고유한 순서를 가지고 있지 않다는 것을 나타냈다. 주황색 카툰 섹션은 KIT로부터 초기에 선택된 서열에 속한다.

[0661] **도 120:** 펩티드 공학 기술 - cKit 수용체 단편 (계속). 아미노 이소부티르산을 이용한 핵심 소수성 도메인의 변형을 통해 효과적인 리간드 제시를 위한, 안정한 나선형 펩티드로의 강한 리간드-링커 자가-접힘을 갖는 랜덤 코일형 펩티드의 안정화.

[0662] 청색 사슬은 잔기 71 내지 94: SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (서열 번호 176) 범위의, KIT에 존재하는 보다 정돈된 나선을 제시하였다. 앵커 및 링커를 갖는 KIT 잔기 71 내지 94: RRRRRRRRRGGGGSGGGGSSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (서열 번호 187)의 NAMD 시뮬레이션.

[0663] 가닥이 링커 잔기와 크게 상호작용하는 구조로 수렴됨. 잔기 71 내지 94의 경우, KIT에서 2개의 다른 나선과 상호작용함으로써 나선을 안정화시키는 소수성 잔기가 존재한다. 소수성 잔기는 적색 (밑줄)으로 제시된다: SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (서열 번호 176). 서열을 변경시켜 소수성 잔기를 제거하고, 하기 서열에 도달하도록 나선형 접힘을 유도하는 것을 돕는 아미노 이소부티르산 (Aib)으로 대체하였다: KIT7194_AIB1: SNYS AibADK AibANAibA DD AibAEAibAKENS (서열 번호 177). Aib를 함유하는 서열을 Rink 수지 상에서 합성하고, 유리 아민 및 아실화된 아민 (Ac)에서 단리하였다. 2차 구조를 원평광 이색성 분석으로 조사하였다.

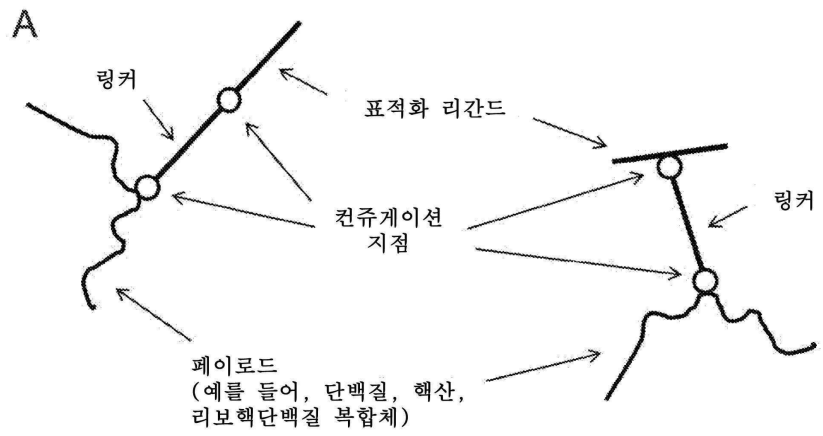
[0664] **도 121:** 펩티드 공학 기술 - cKit 수용체 단편 (계속)

[0665] SCF_mcKit_(4GS)2_9R_N 및 SCF_mcKit(Ac)_(4GS)2_9R_N의 원평광 이색성 분석. 리간드 말단의 아세틸화를 이용하여 하전된 폴리펩티드 말단의 전하를 중성화시킬 수 있다. 상단: KIT7194_AIB1의 CD는, Aib 단위를 함유하는 알파-나선 및 나선들의 2차 구조와 일치하는, (222) 주변의 약간의 딥(dip) 및 (208) 주변의 큰 딥을 나타낸다. 하단: KIT7194_AIB1_Ac는 KIT7194_AIB1에 대한 것과 유사한 CD를 나타낸다. 때때로 아실화는 접힘을 보조할 수는 있지만, 필수적인 것으로 보이지는 않는다. 아세틸화는 또한 리간드 상호작용에 도움을 줄 수 있기에, 말단 아민은 하전된 것이 아니라 중성이어야 한다. 전체 앵커-링커-KIT7194_AIB1 구성: RRRRRRRRR - GGGGSGGGGS - SNYS AibADK AibANAibA DD AibAEAibAKENS (서열 번호 188).

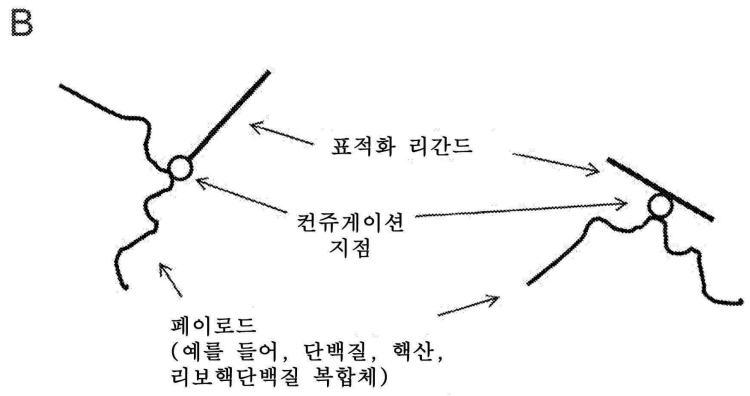
[0666] **도 122:** 펩티드 공학 기술 - cKit 수용체 단편. 아미노 이소부티르산을 이용한 핵심 소수성 잔기의 변형 후 SCF_mcKit(Ac)_(4GS)2_9R_N의 안정한 입체구조.

도면

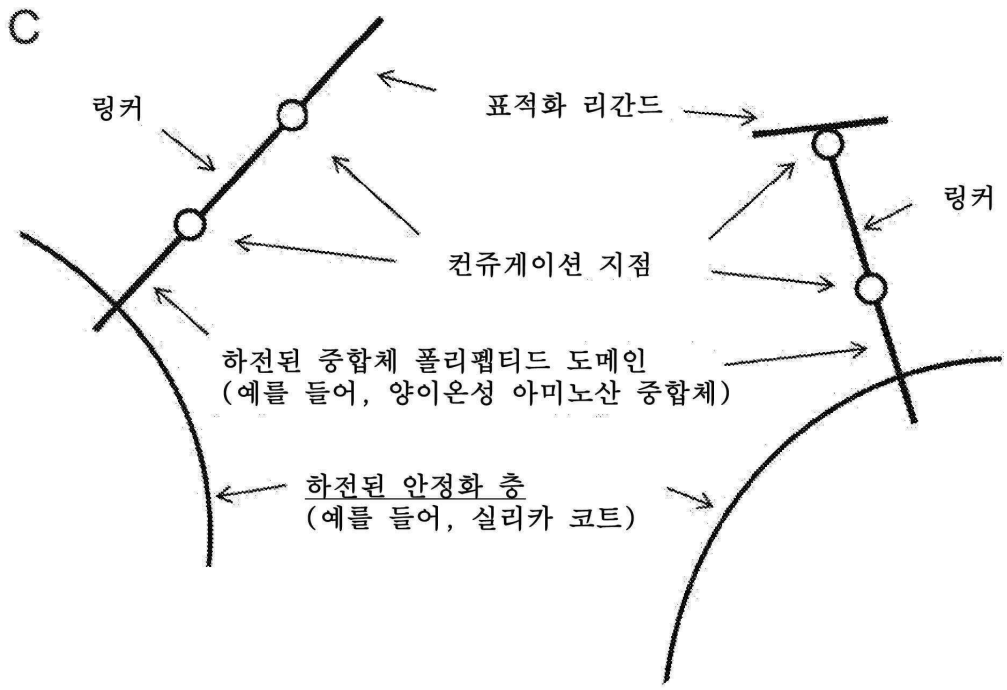
도면1a



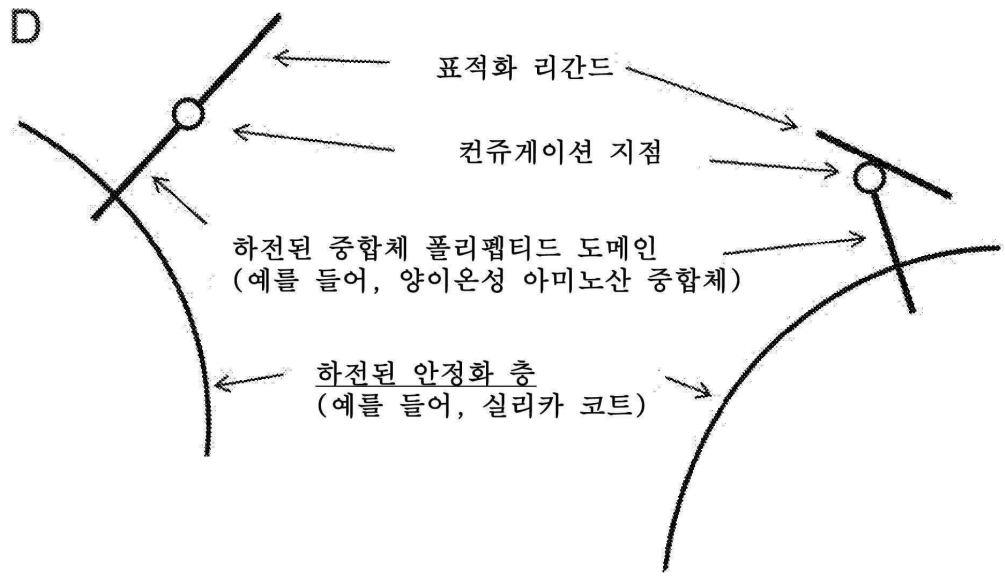
도면1b


B
표적화 리간드
컨쥬게이션
지점
페이로드
(예를 들어, 단백질, 핵산,
리보핵단백질 복합체)

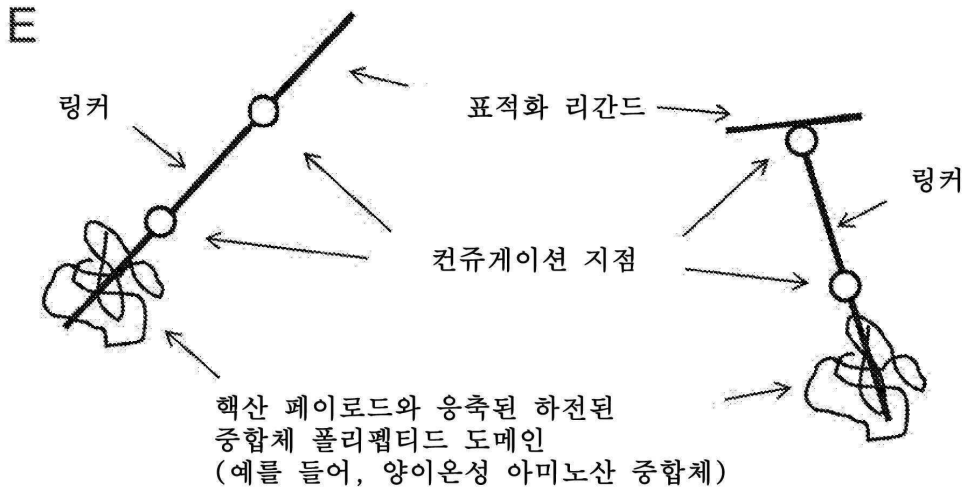
도면1c


C
링커
표적화 리간드
링커
컨쥬게이션 지점
하전된 중합체 폴리펩티드 도메인
(예를 들어, 양이온성 아미노산 중합체)
하전된 안정화 층
(예를 들어, 실리카 코트)

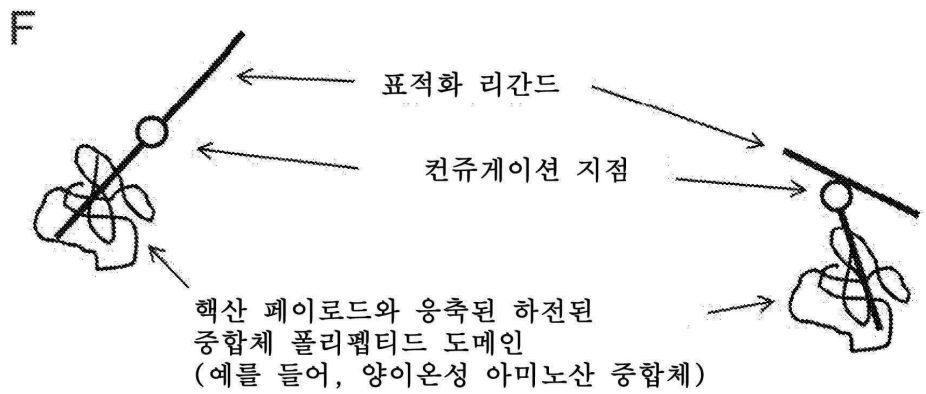
도면1d



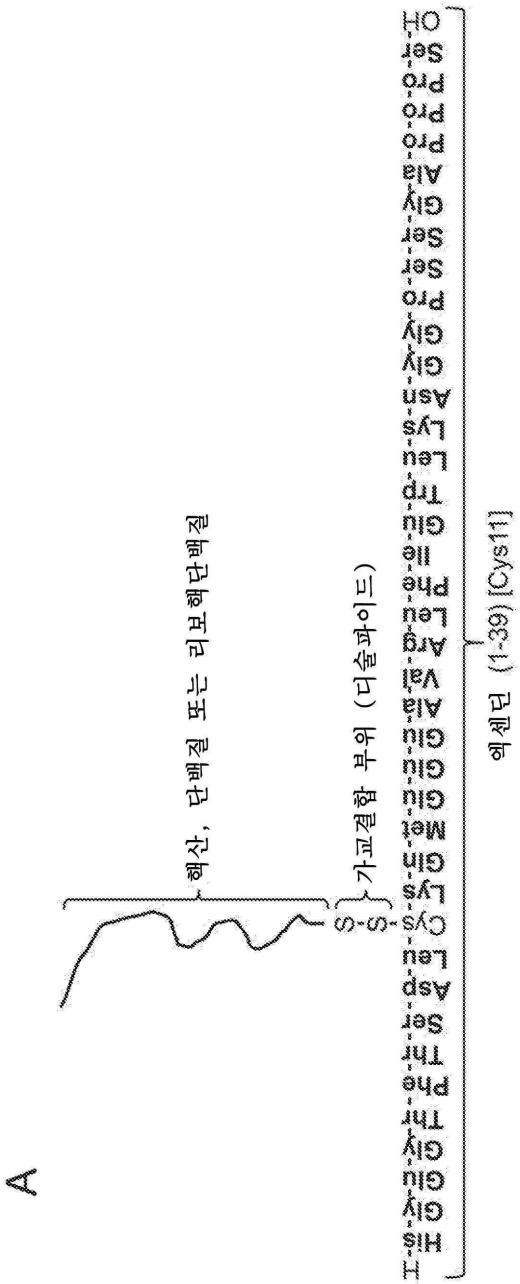
도면1e



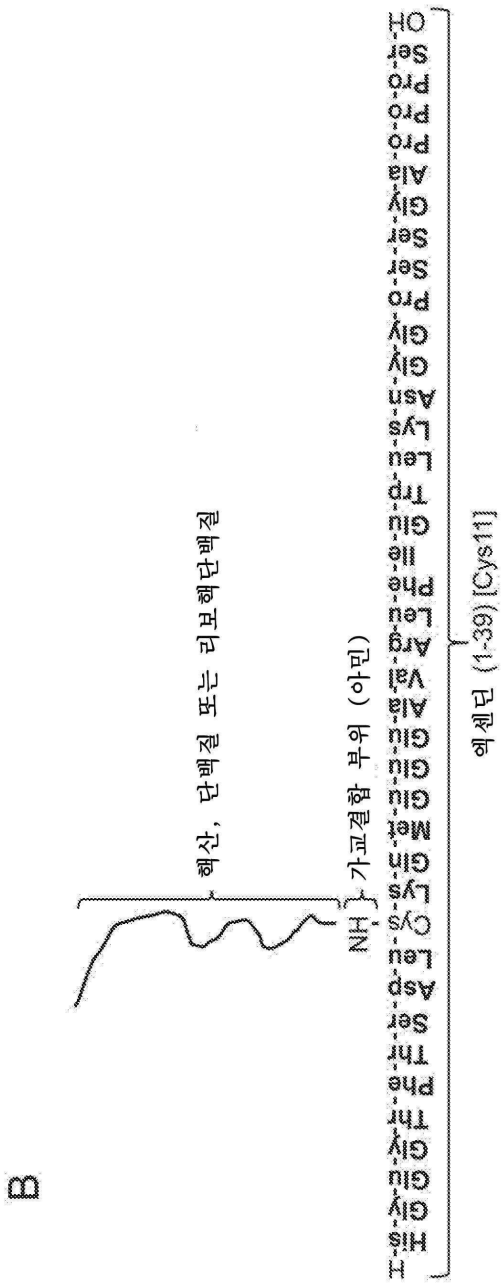
도면1f



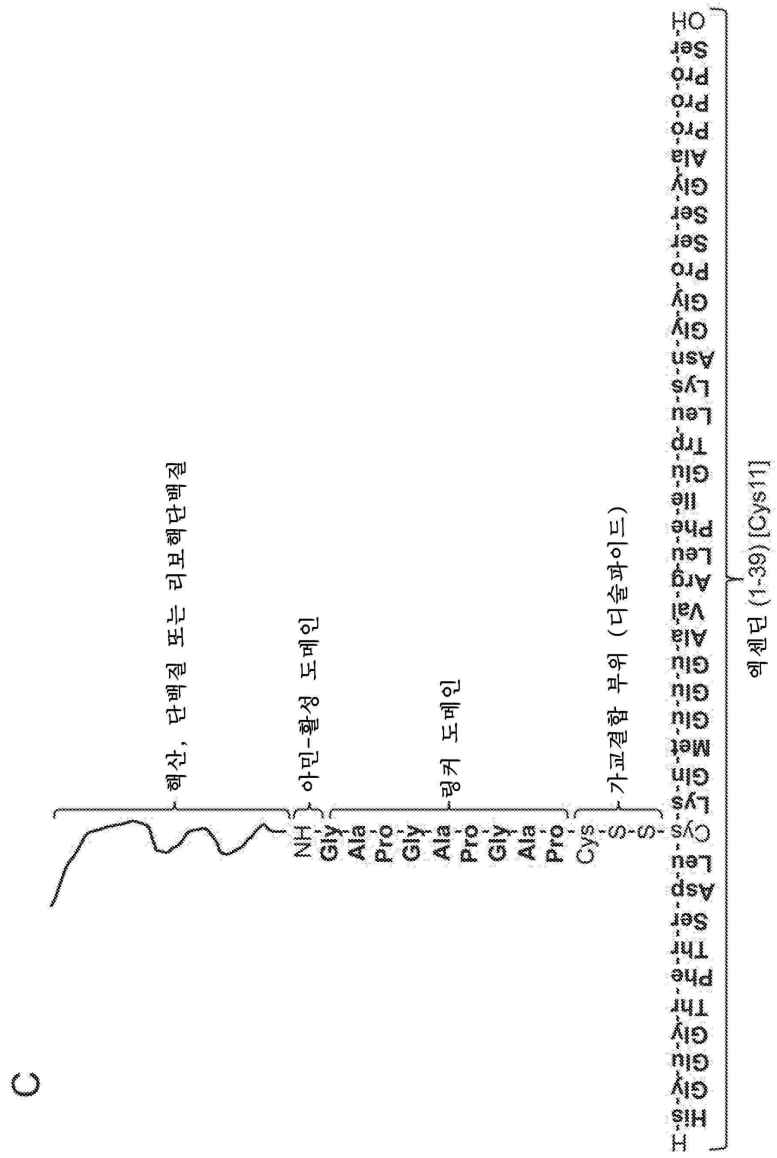
도면2a


A
His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Cys-Gln-Met-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-OH
S-S
절산, 단백질 또는 리보핵단백질
가교결합 부위 (디술파이드)
엑센딘 (1-39) [Cys11]

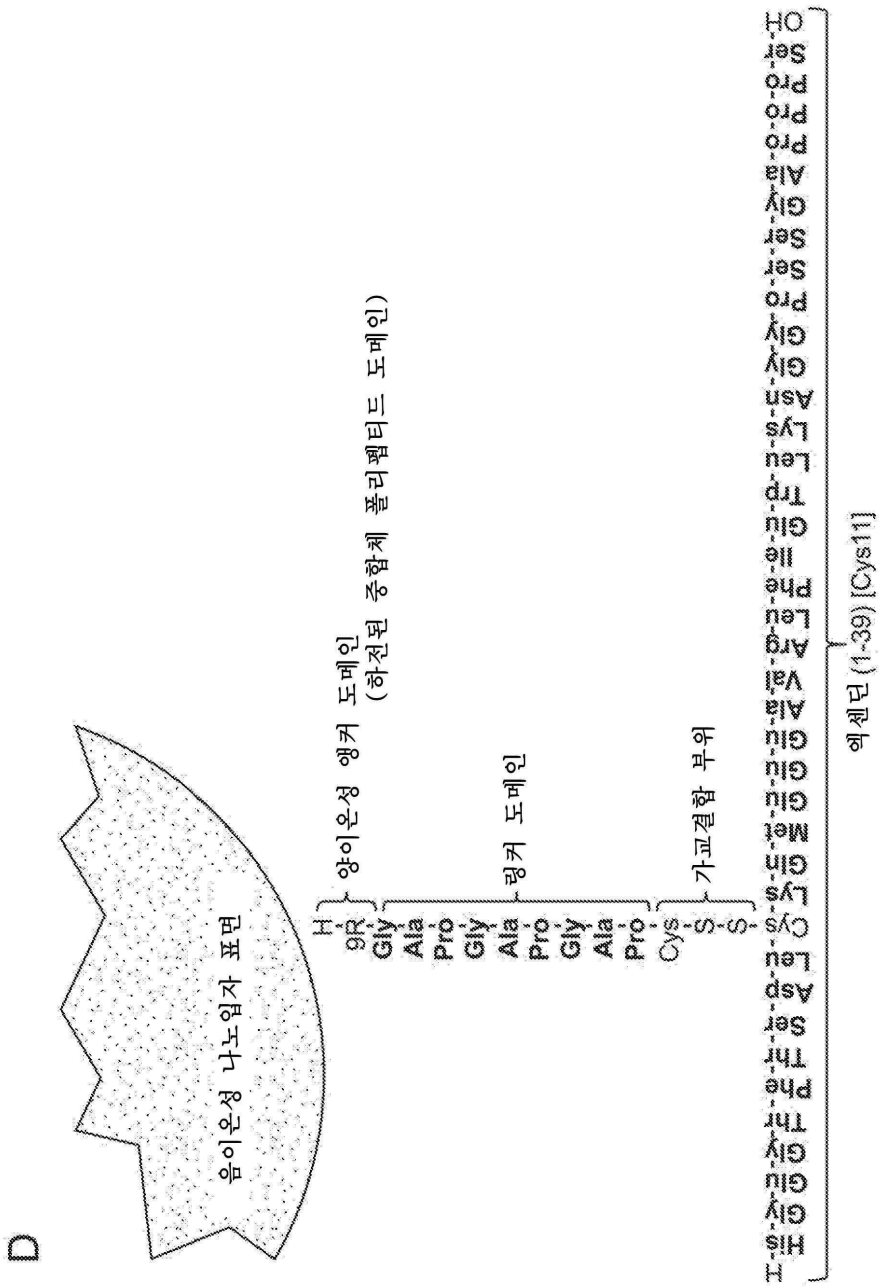
도면2b


B
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Cys Lys Gln Met Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser OH
NH2 가교결합 부위 (아민)
혁산, 단백질 또는 리보핵단백질
엑센딘 (1-39) [Cys11]

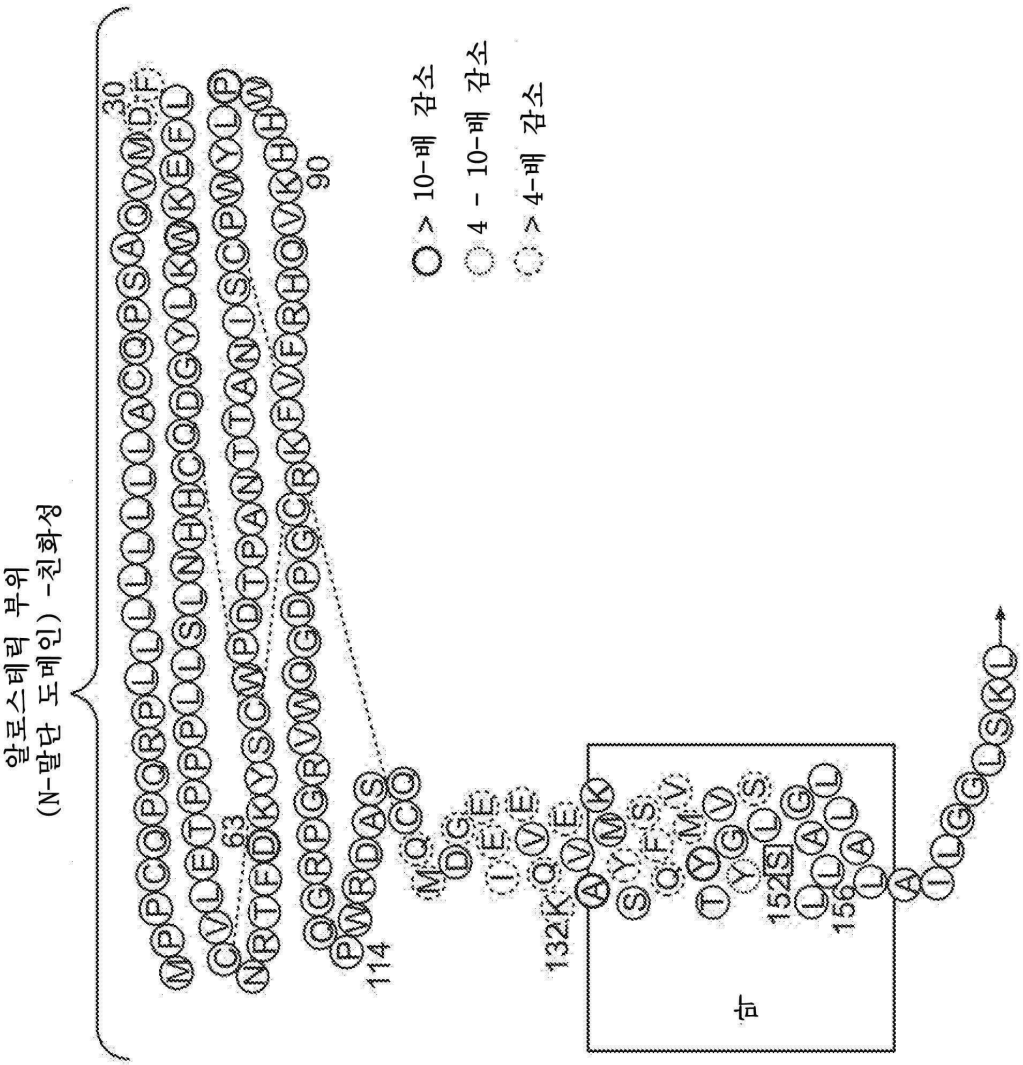
도면2c


C
His
Gly
Glu
Gly
Thr
Phe
Thr
Ser
Asp
Leu
Cys
Gln
Met
Glu
Glu
Glu
Ala
Val
Arg
Leu
Phe
Ile
Glu
Trp
Leu
Lys
Asn
Gly
Gly
Pro
Ser
Ser
Gly
Ala
Pro
Pro
Ser
OH
엑센딘 (1-39) [Cys11]
가교결합 부위 (디술파이드)
S-S
Cys
Pro
Gly
Ala
Pro
Gly
Ala
Pro
링커 도메인
Gly
아민-활성 도메인
NH
핵산, 단백질 또는 리포핵단백질

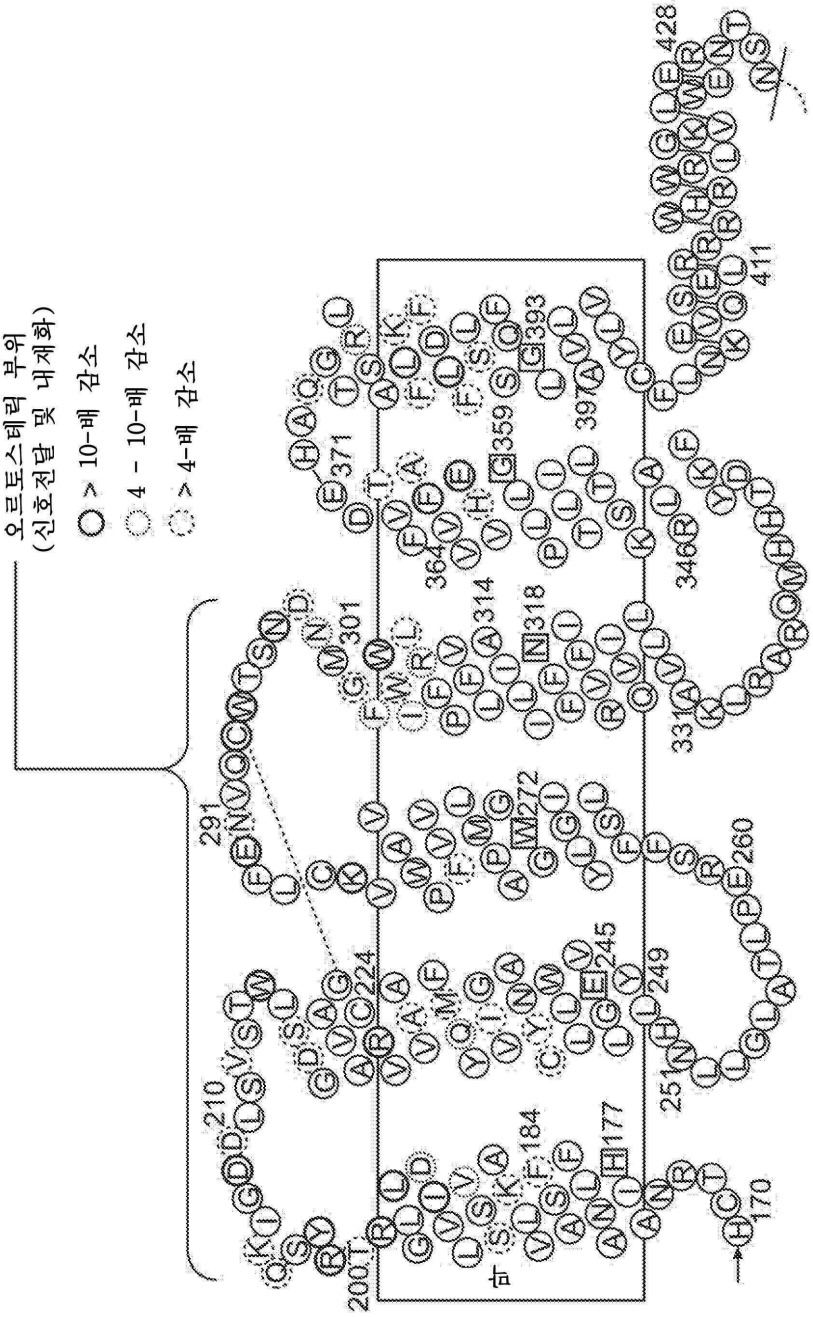
도면2d


D
음이온성 나노입자 표면
H
gR
양이온성 앵커 도메인
(하전된 중합체 폴리펩티드 도메인)
Gly
Ala
Pro
Gly
Ala
Pro
Gly
Ala
Pro
링커 도메인
Cys
S
S
가교결합 부위
Cys
Gly
Asp
Ser
Thr
Phe
Thr
Arg
Leu
Asp
Glu
Asp
Glu
Ala
Val
Arg
Phe
Glu
Trp
Leu
Lys
Asn
Gly
Gly
Pro
Ser
Gly
Ala
Pro
Pro
Ser
OH
His
엑센딘 (1-39) [Cys11]

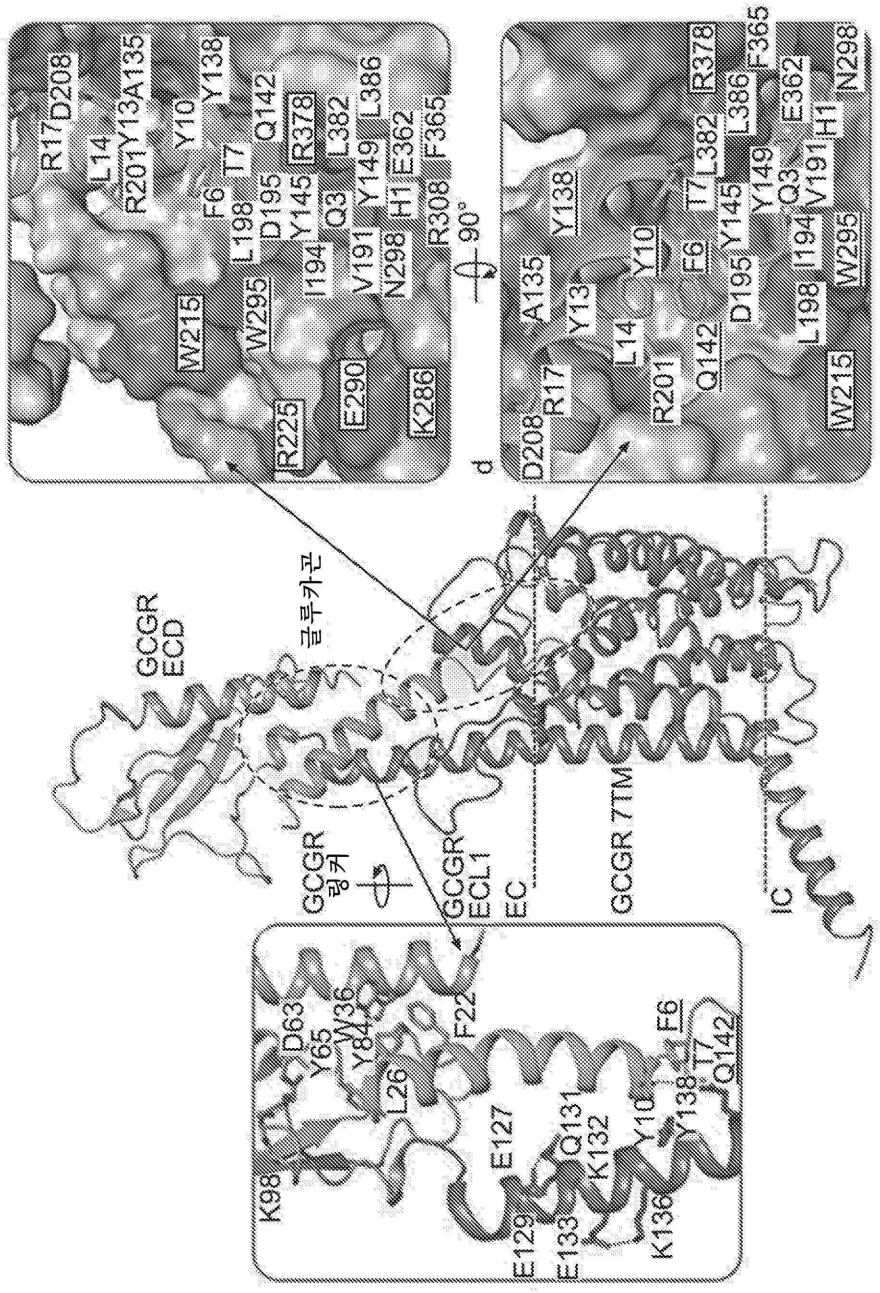
도면3a



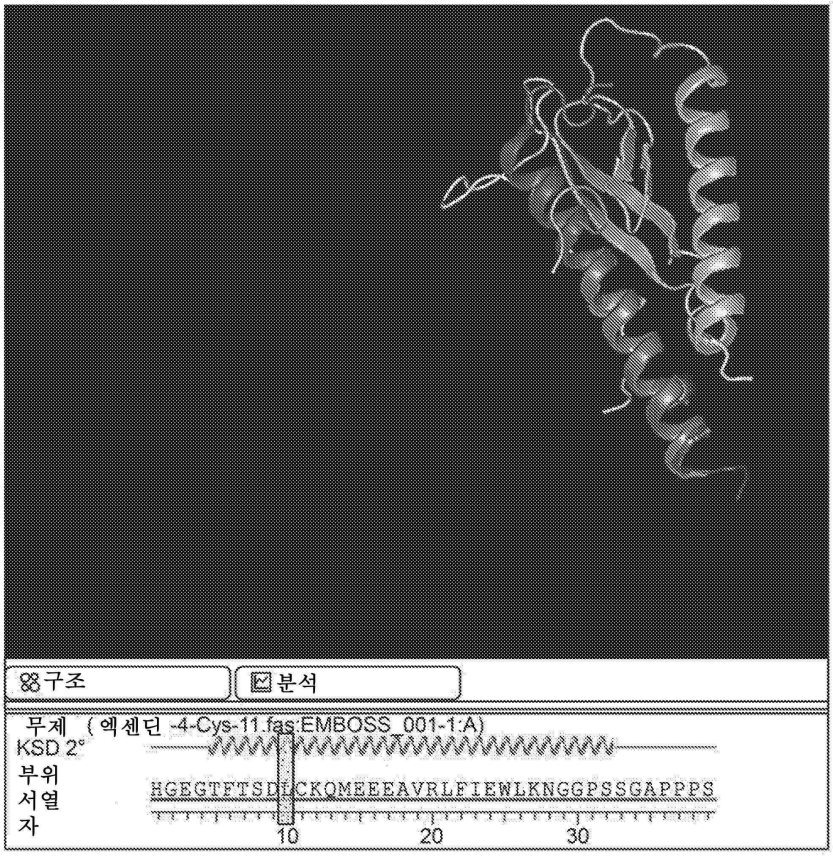
도면3b



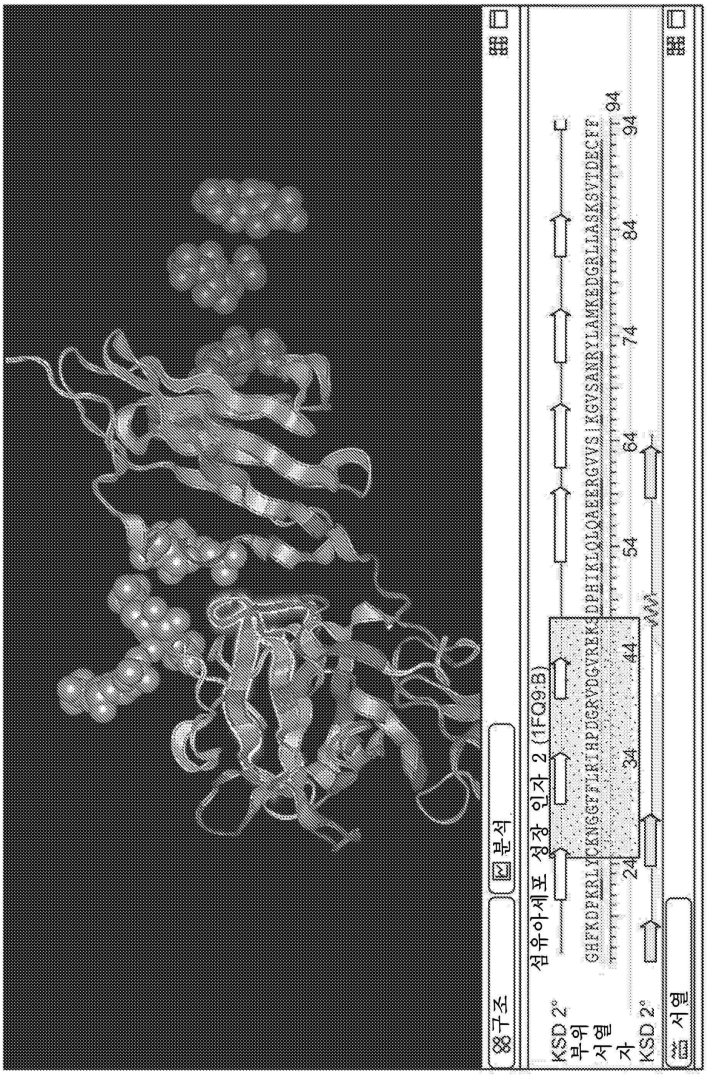
도면4a


GCGR ECD
글루카곤
GCGR 링커
GCGR ECL1
EC
GCGR 7TM
IC
90°
d
R17
D208
L14
R201
Y13
A135
Y10
Y138
F6
T7
Q142
L198
D195
R378
W295
Y145
L382
I194
Q3
Y149
L386
V191
H1
E362
N298
W215
R308
F365
E290
K286
R225
A135
Y138
Y13
Y10
L14
F6
T7
R201
Q142
D195
Y145
L382
R378
F365
Y149
L386
Q3
E362
L198
I194
V191
H1
N298
W215
W295
D208
R17
K98
D63
Y65
W36
Y84
F22
L26
E127
Q131
K132
Y10
F6
T7
Y138
Q142
E129
E133
K136

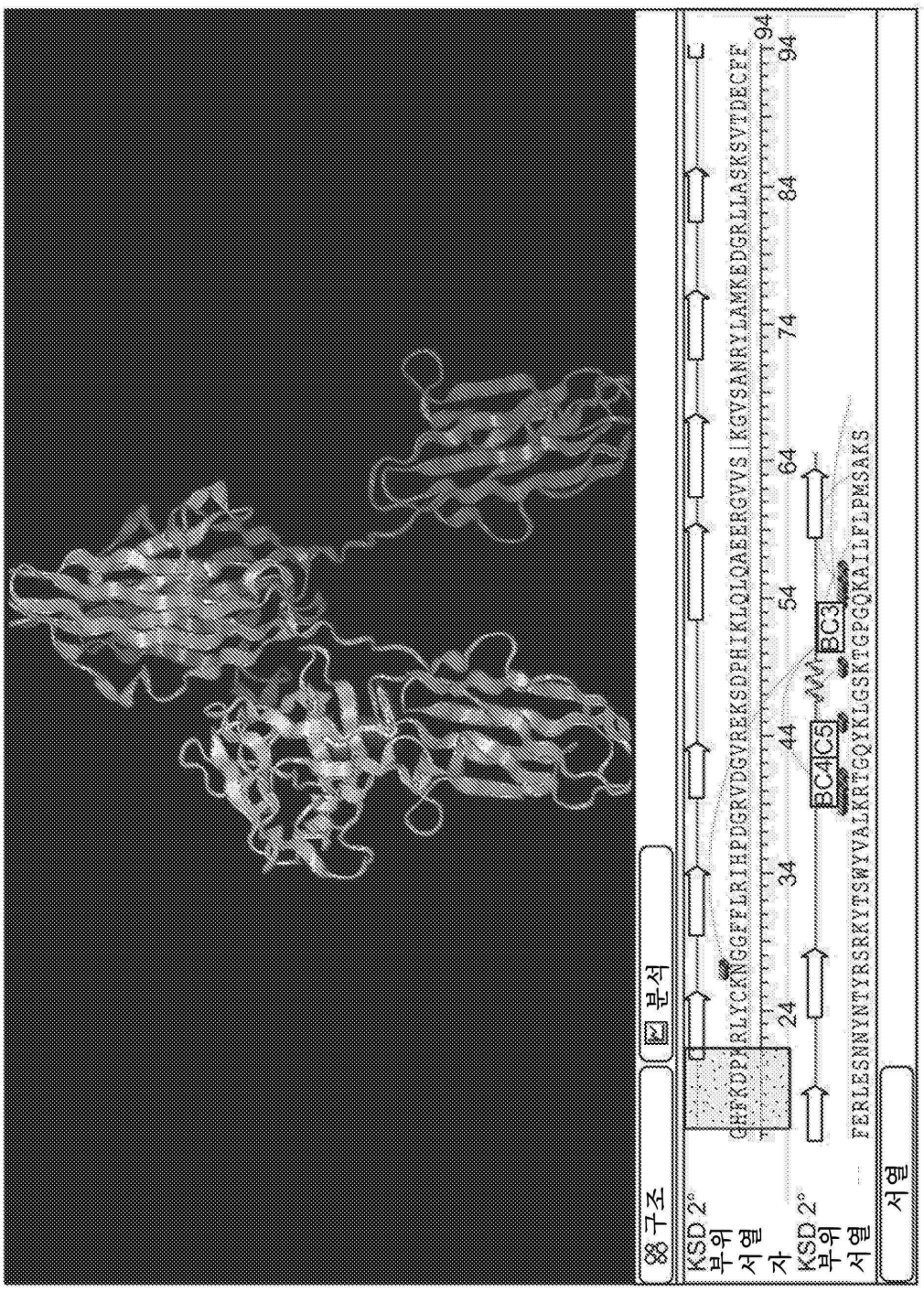
도면4b


구조
분석
무제 (엑센딘 -4-Cys-11.fas:EMBOSS_001-1:A)
KSD 2°
부위
서열
자
HGEGTFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
10
20
30

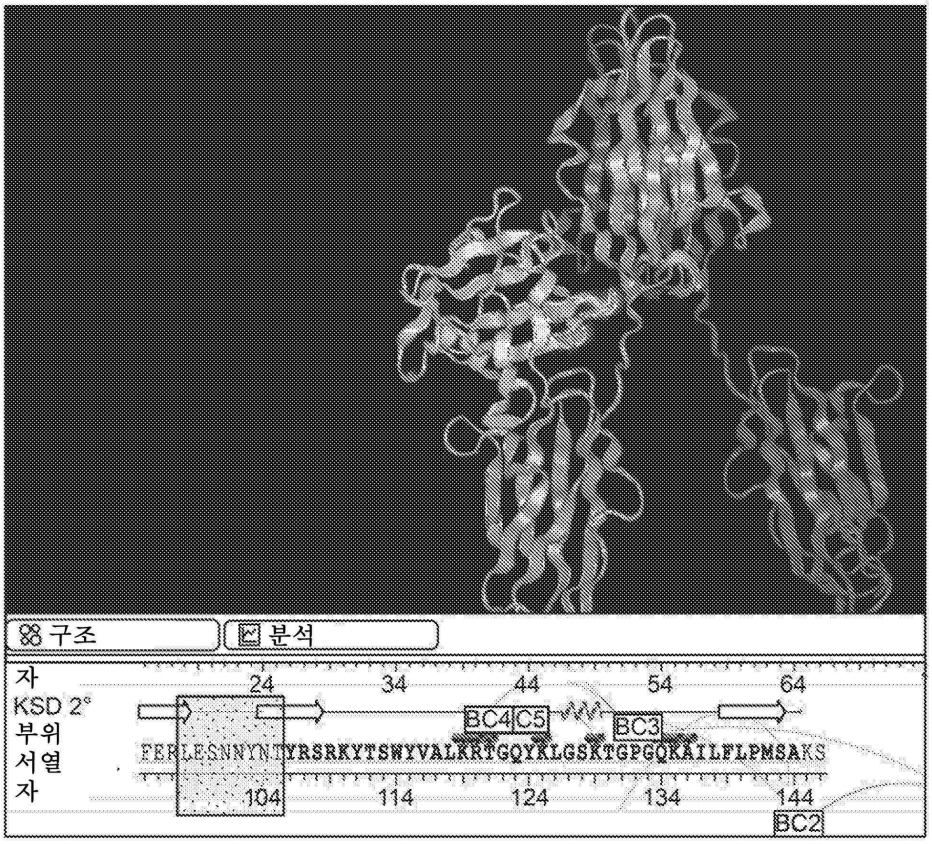
도면5


구조
분석
섬유아세포 성장 인자 2 (1FQ9:B)
KSD 2° 부위 서열 자
GHFKDPKRLYCKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVVSIKGVSANRYLAMKEDGRLLASKSVTDECFF
24
34
44
54
64
74
84
94
94
KSD 2°
서열

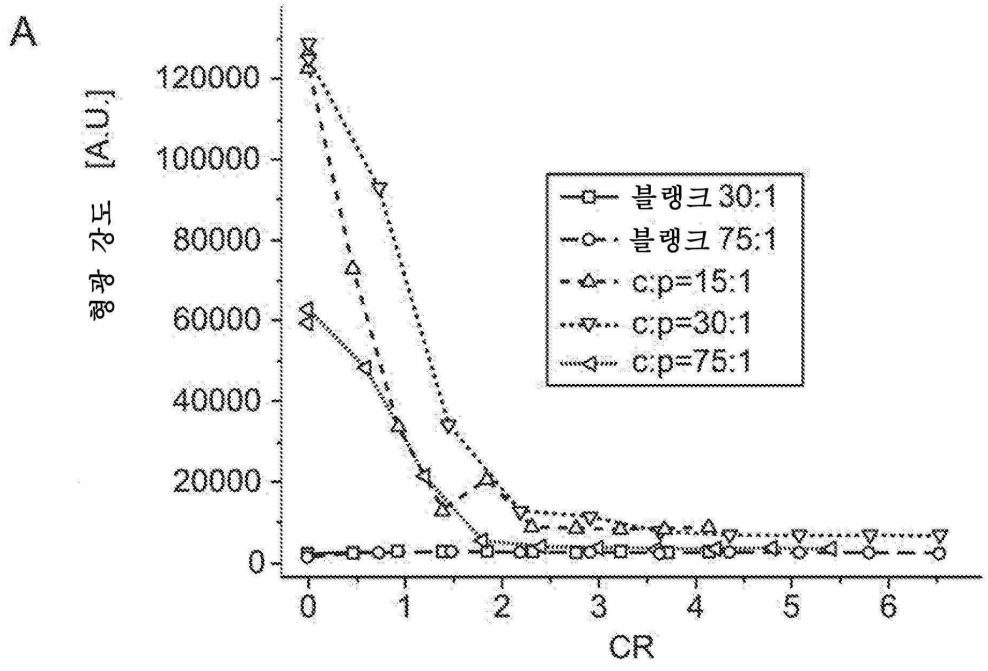
도면6


구조
분석
KSD 2° 부위 서열
자
KSD 2° 부위 서열
서열
RLYCKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVVS
FERLESNWYNTYRSRKYTSWYVALKRTGQYKLGSKTGPGQKAILFLPMSAKS
EC4
EC5
EC3
24
34
44
54
64
74
84
94

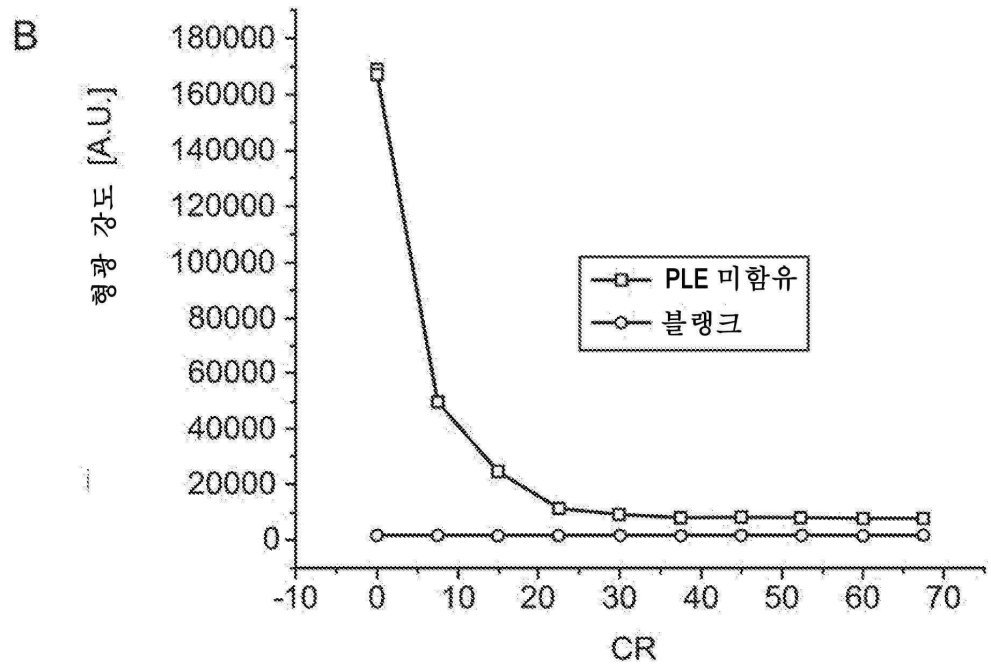
도면7


구조
분석
자
KSD 2°
부위
서열
자
24
34
44
54
64
BC4
C5
BC3
FEKLESNNYNTYRSRKYTSWYVALKRTGQYKLGSKTGPGQKAILFLPMSAKS
104
114
124
134
144
BC2

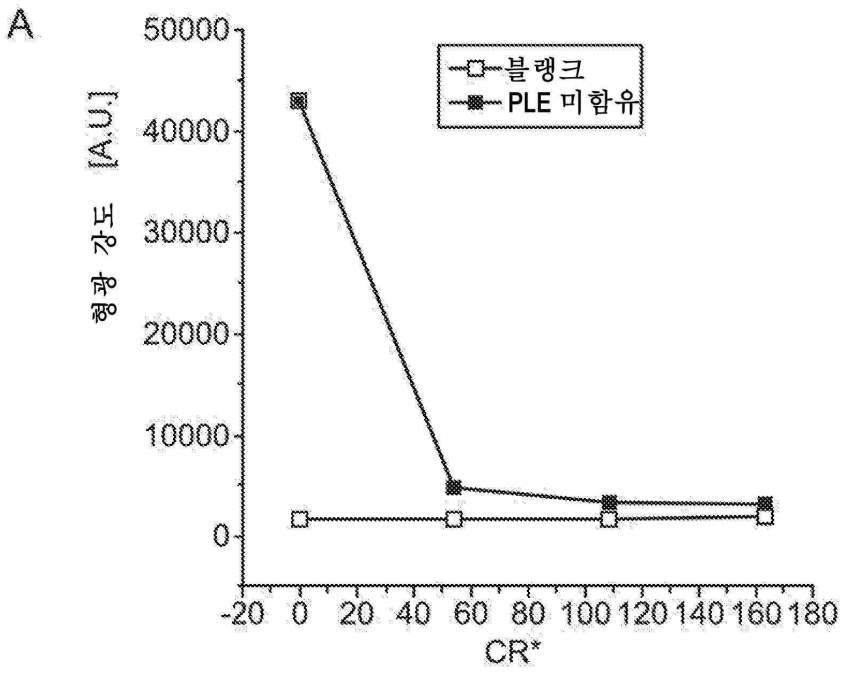
도면8a


A
형광 강도 [A.U.]
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0
1
2
3
4
5
6
CR
블랭크 30:1
블랭크 75:1
c:p=15:1
c:p=30:1
c:p=75:1

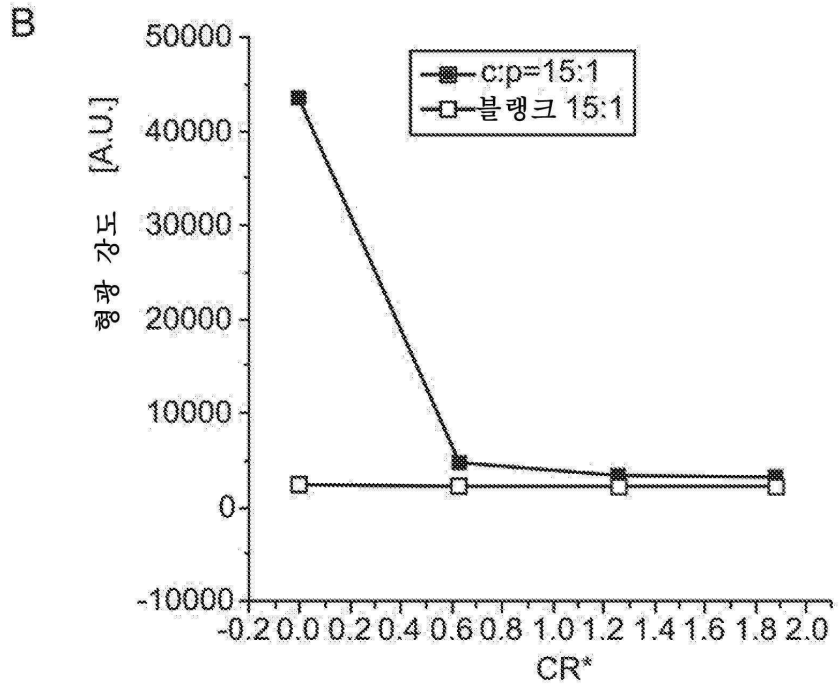
도면8b


B
형광 강도 [A.U.]
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
CR
PLE 미함유
블랭크

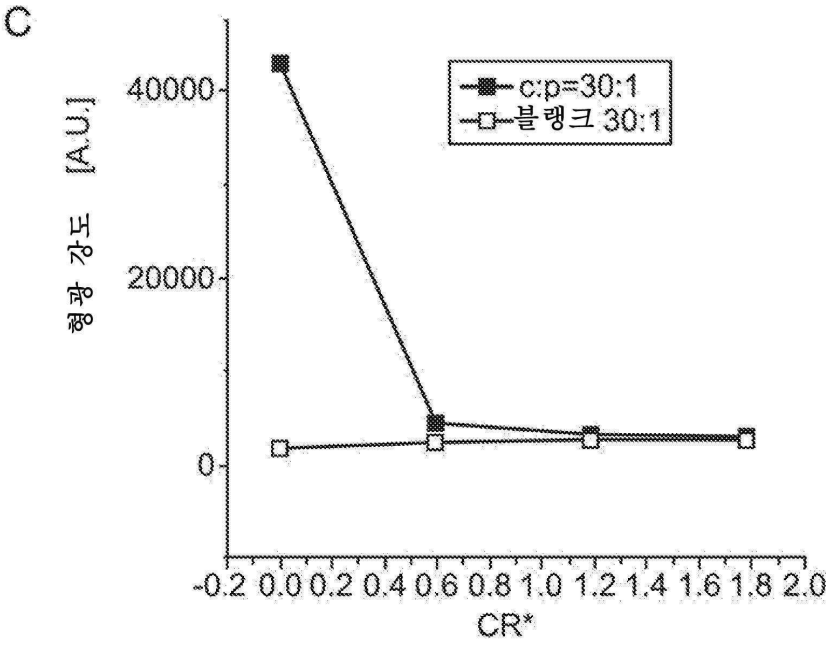
도면9a


A
형광 강도 [A.U.]
50000
40000
30000
20000
10000
0
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
CR*
블랭크
PLE 미함유

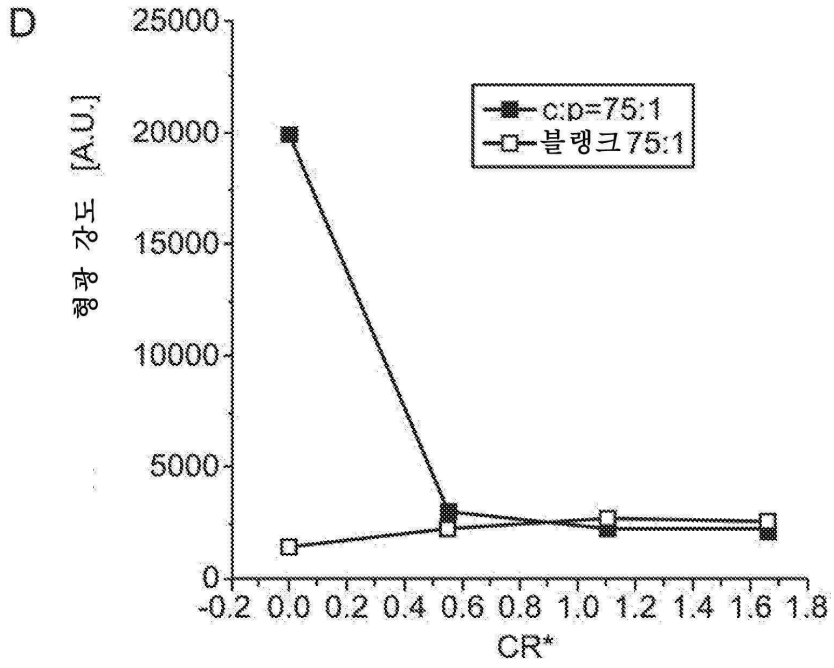
도면9b


B
50000
40000
30000
20000
10000
0
-10000
형광 강도 [A.U.]
c:p=15:1
블랭크 15:1
-0.2 0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4 1.6 1.8 2.0
CR*

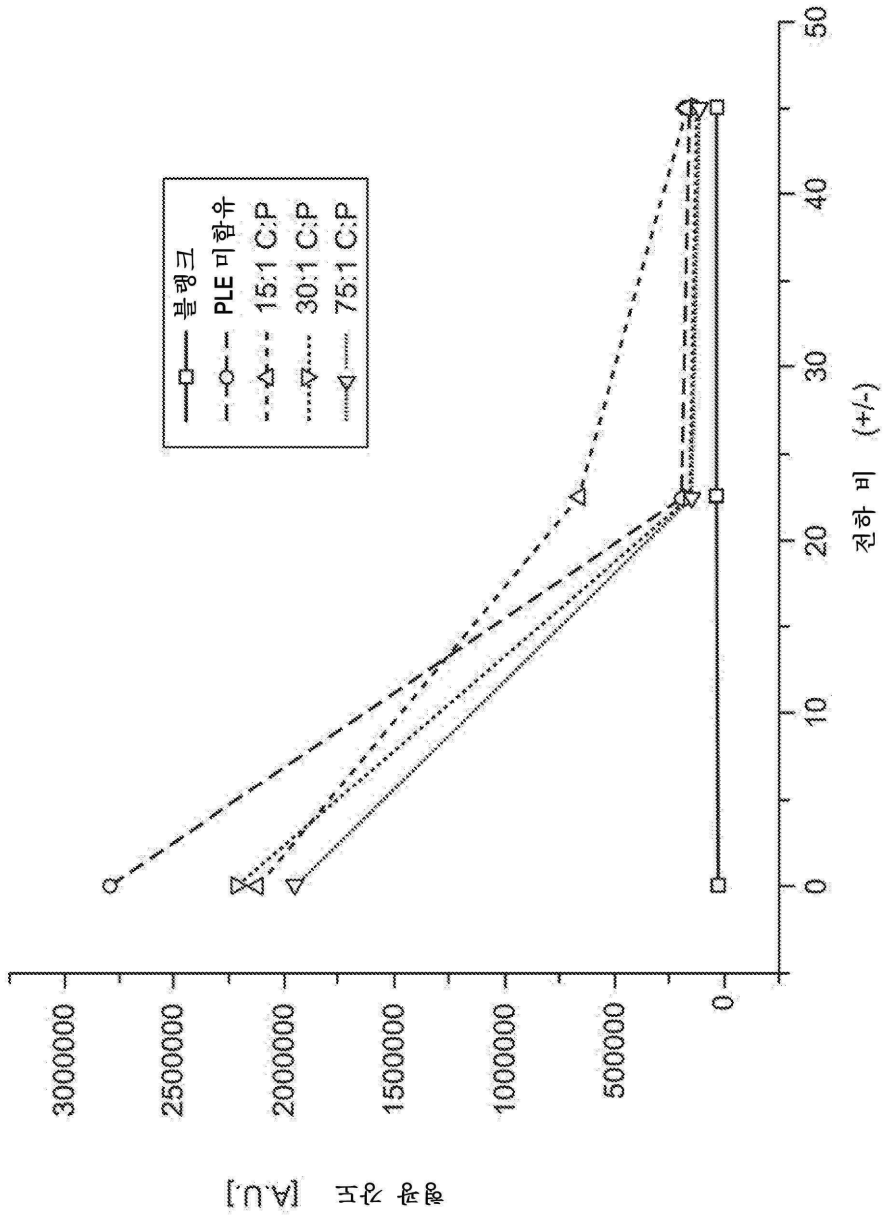
도면9c


C
40000
20000
0
형광 강도 [A.U.]
c:p=30:1
블랭크 30:1
-0.2 0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4 1.6 1.8 2.0
CR*

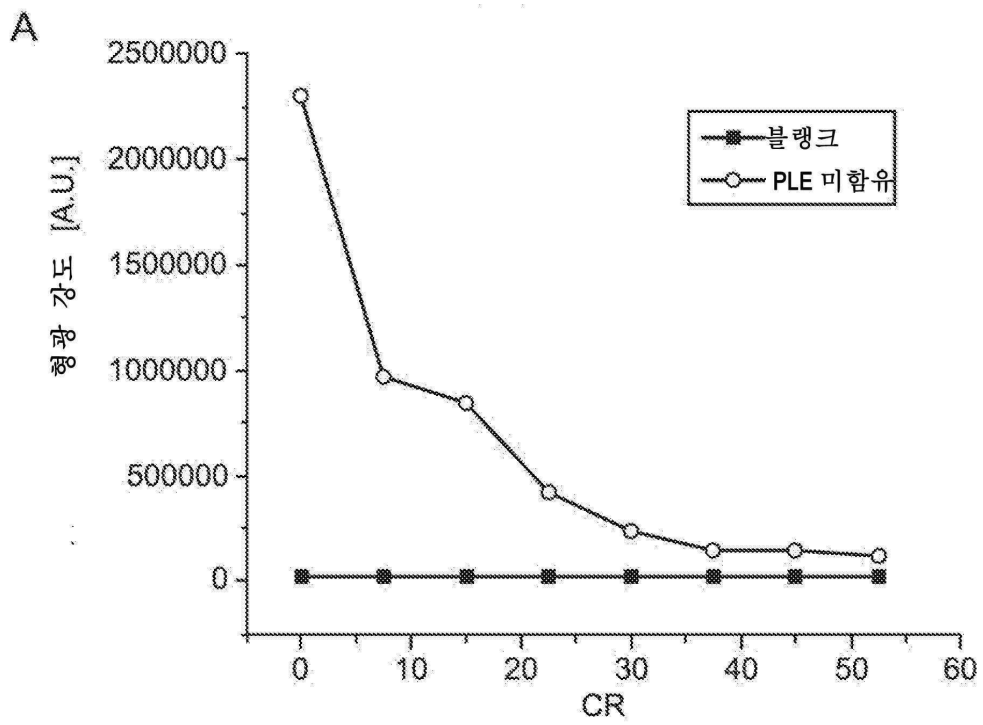
도면9d


D
25000
20000
15000
10000
5000
0
형광 강도 [A.U.]
c:p=75:1
블랭크75:1
-0.2 0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4 1.6 1.8
CR*

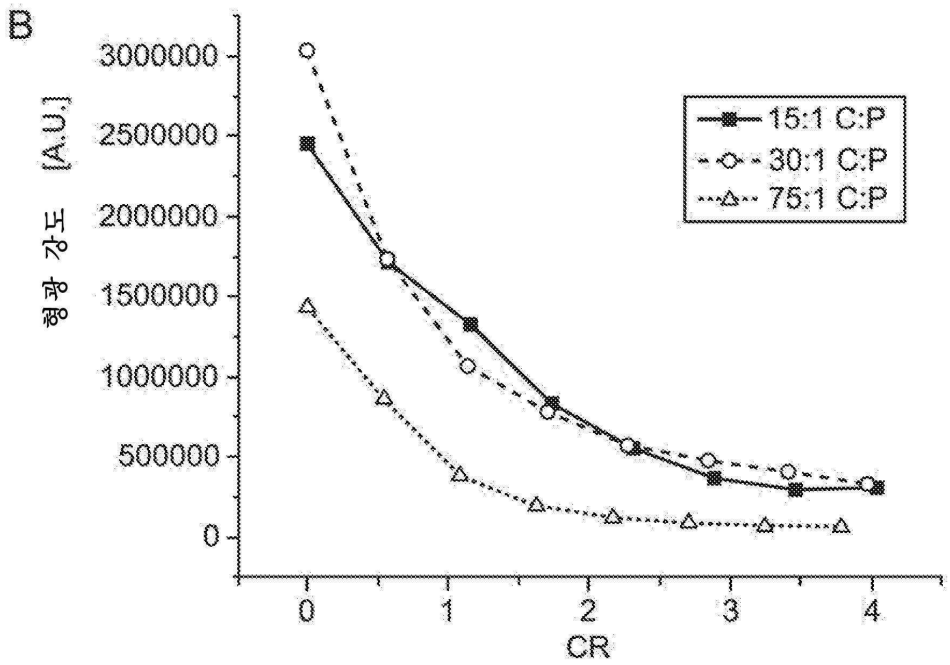
도면10


블랭크
PLE 미함유
15:1 C:P
30:1 C:P
75:1 C:P
형광 강도 [A.U.]
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
10
20
30
40
50
전하 비 (+/-)

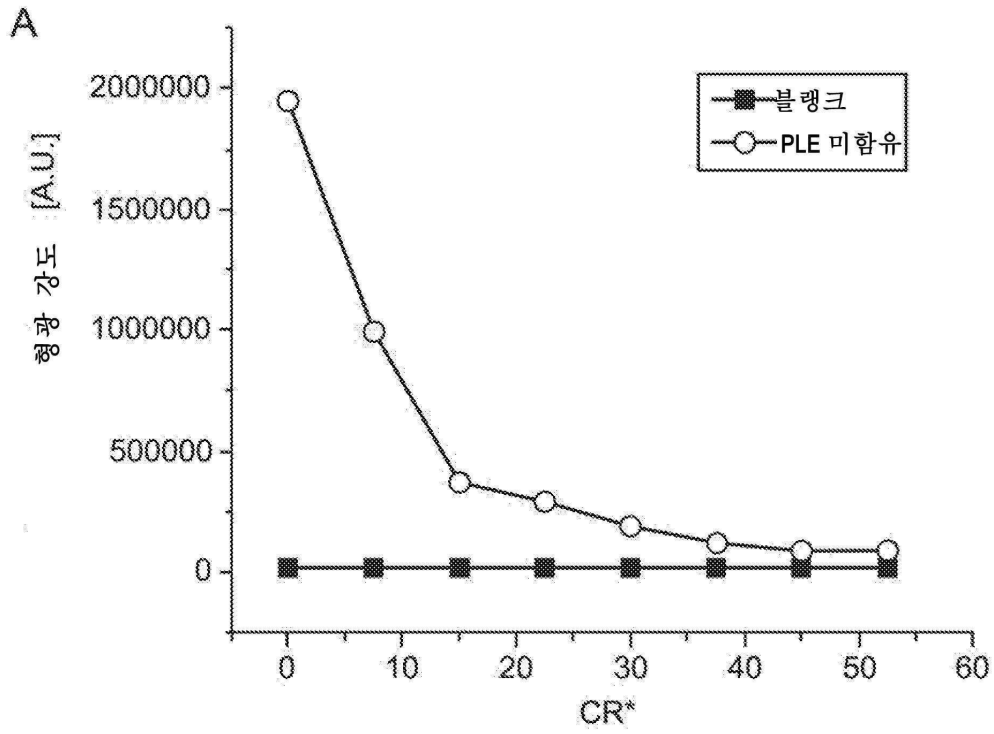
도면11a


A
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
형광 강도 [A.U.]
0
10
20
30
40
50
60
CR
블랭크
PLE 미함유

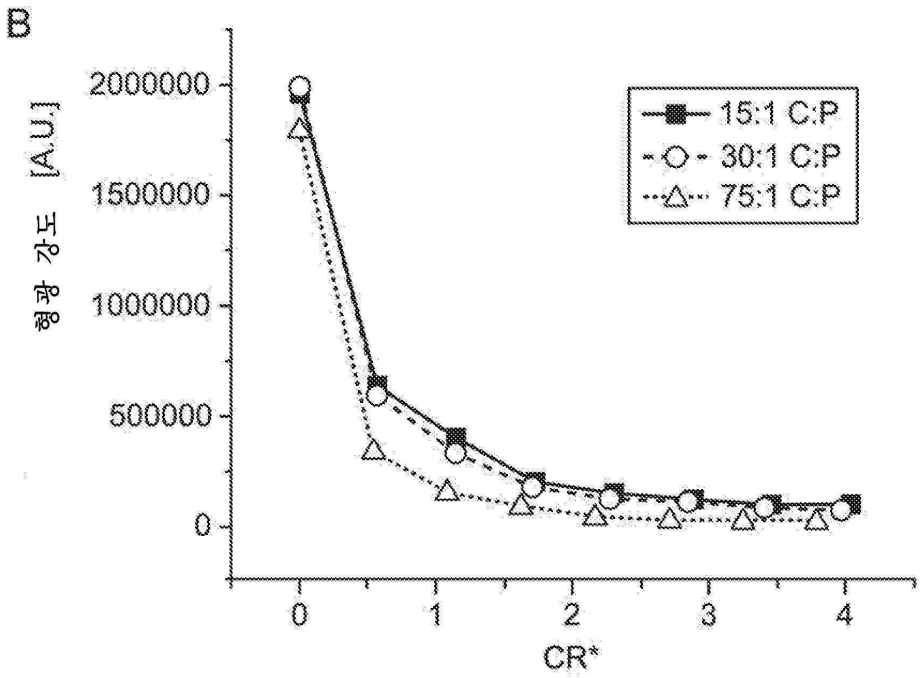
도면11b


B
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
형광 강도 [A.U.]
0
1
2
3
4
CR
15:1 C:P
30:1 C:P
75:1 C:P

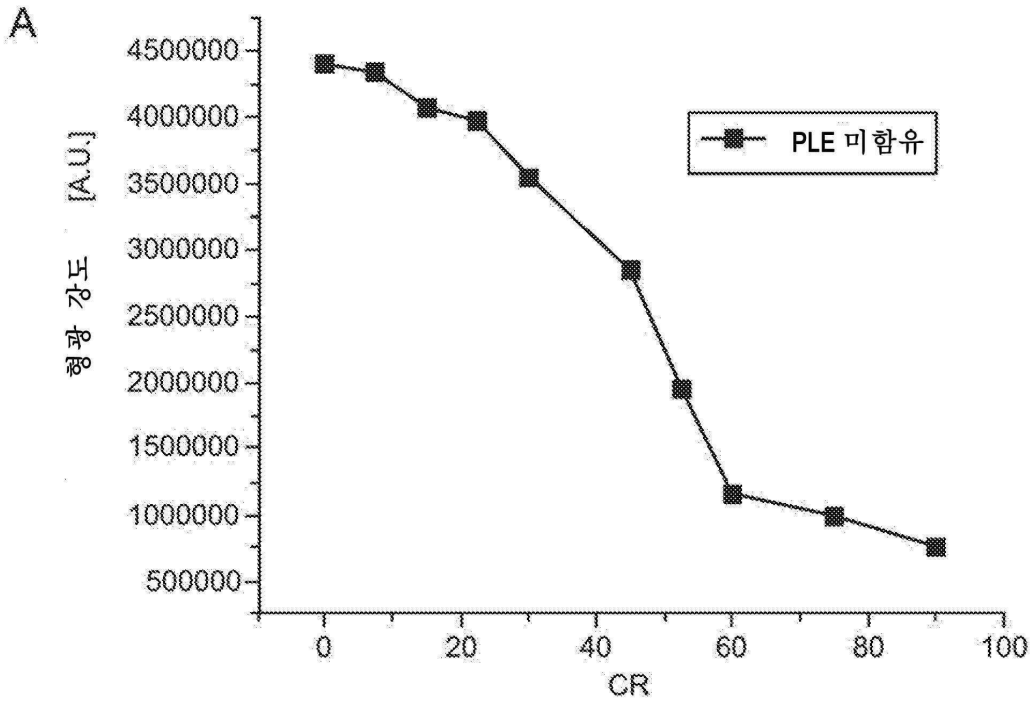
도면12a


A
형광 강도 [A.U.]
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
10
20
30
40
50
60
CR*
블랭크
PLE 미함유

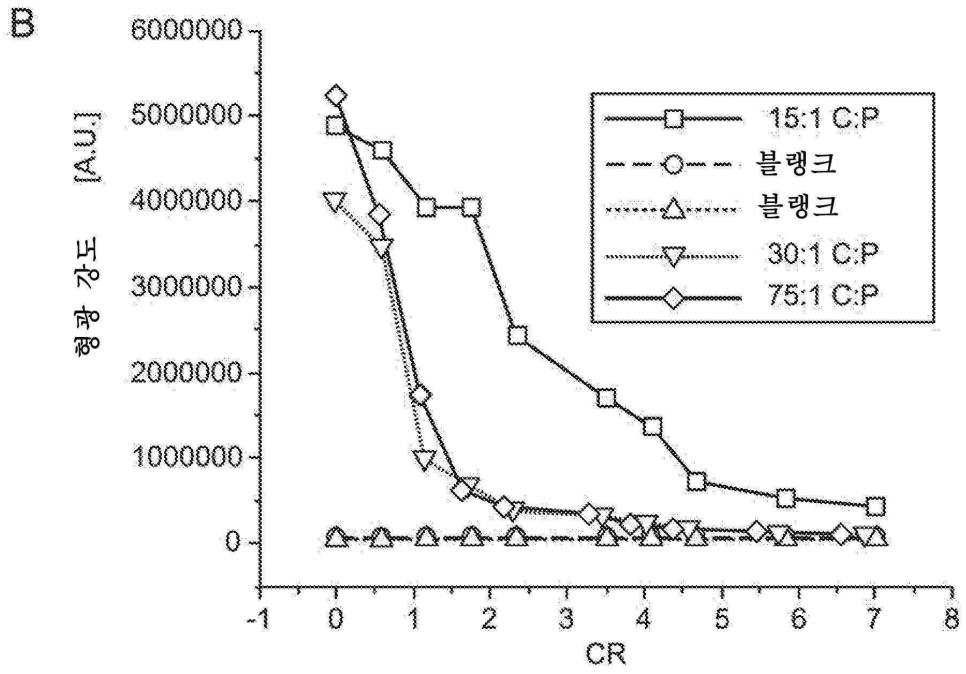
도면12b


B
형광 강도 [A.U.]
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
1
2
3
4
CR*
15:1 C:P
30:1 C:P
75:1 C:P

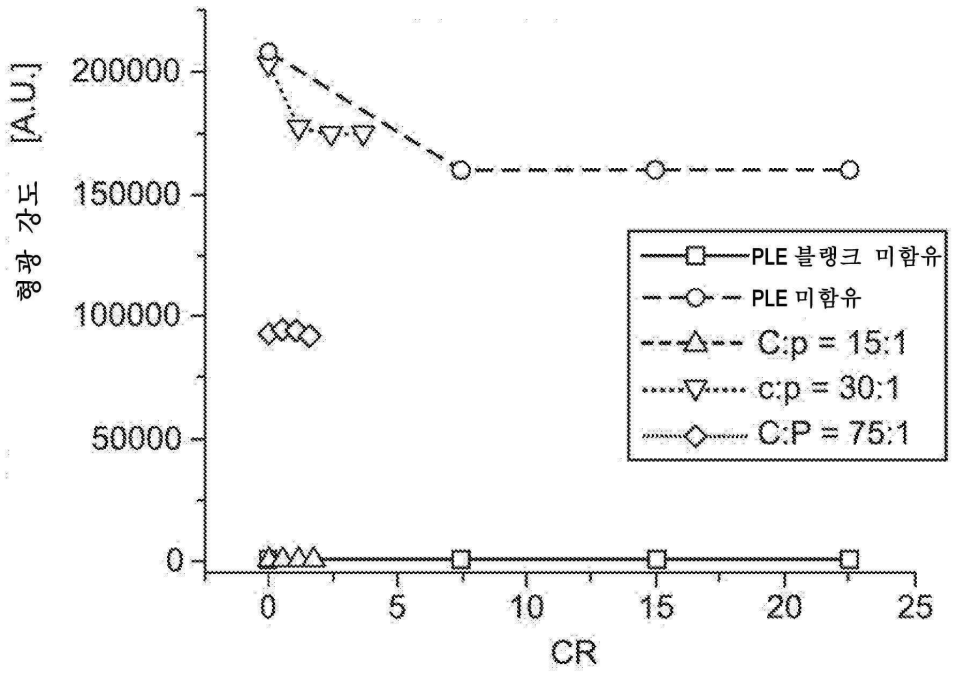
도면13a


A
형광 강도 [A.U.]
4500000
4000000
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
20
40
60
80
100
CR
PLE 미함유

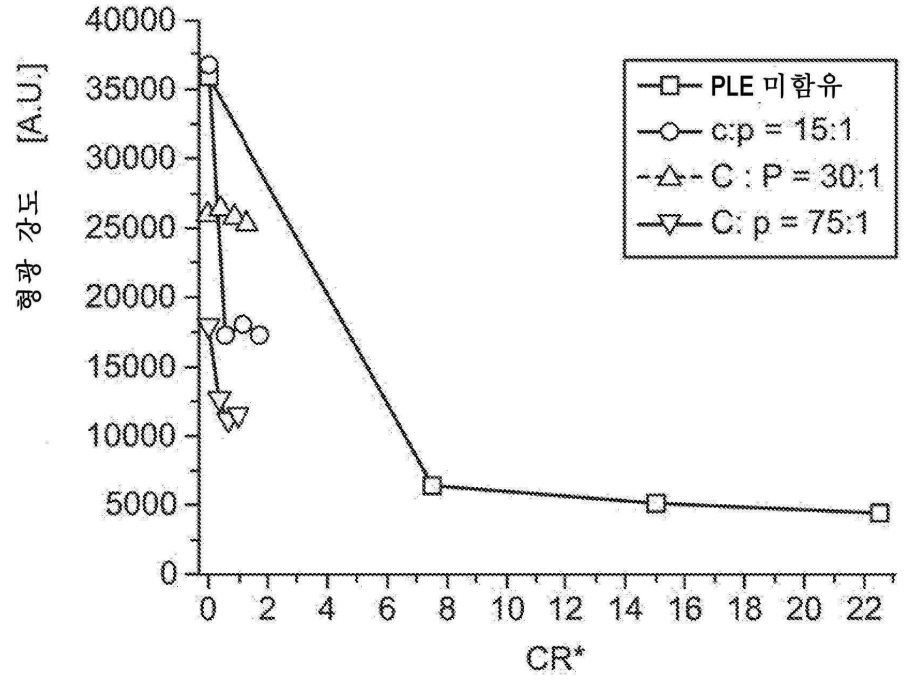
도면13b


B
형광 강도 [A.U.]
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
CR
15:1 C:P
블랭크
블랭크
30:1 C:P
75:1 C:P

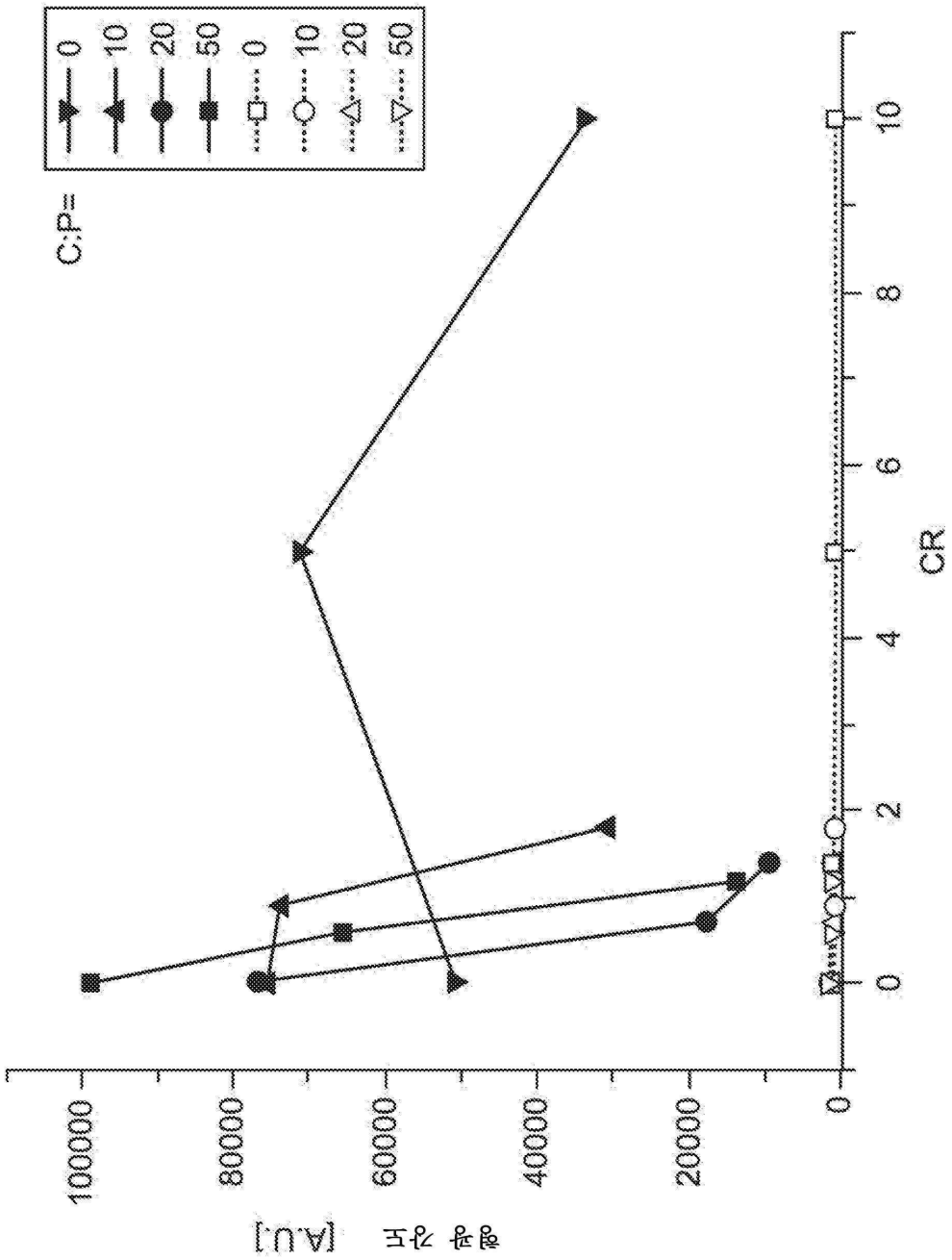
도면14


형광 강도 [A.U.]
200000
150000
100000
50000
0
0
5
10
15
20
25
CR
PLE 블랭크 미함유
PLE 미함유
C:p = 15:1
c:p = 30:1
C:P = 75:1

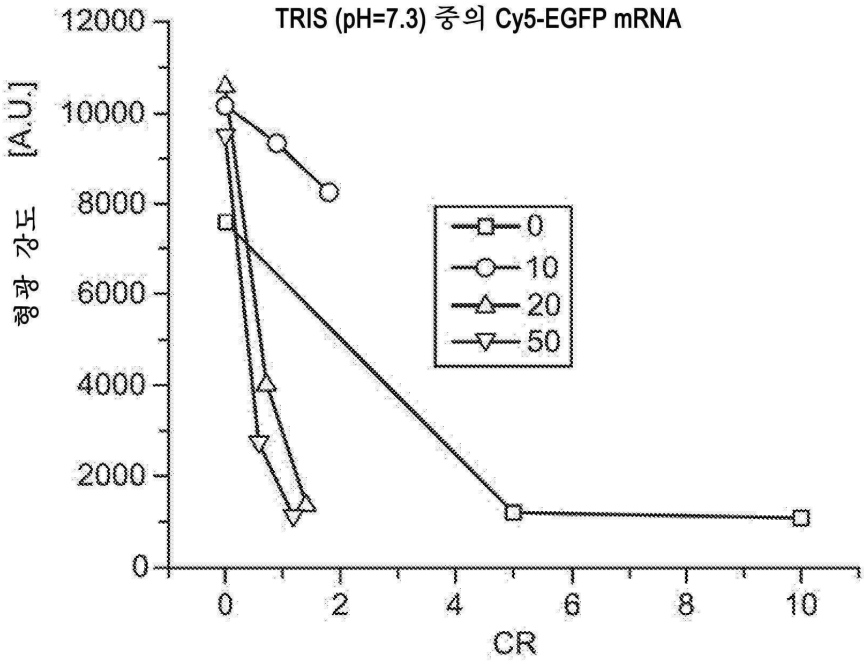
도면15


형광 강도 [A.U.]
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
CR*
PLE 미함유
c:p = 15:1
C : P = 30:1
C: p = 75:1

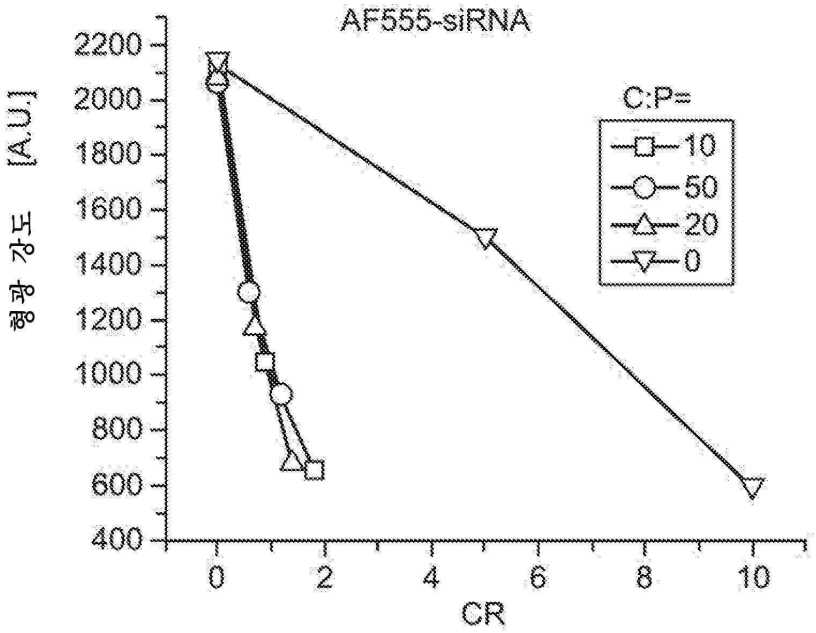
도면16


C:P=
0
10
20
50
0
10
20
50
CR
0
2
4
6
8
10
형광 강도 [A.U.]
0
20000
40000
60000
80000
100000

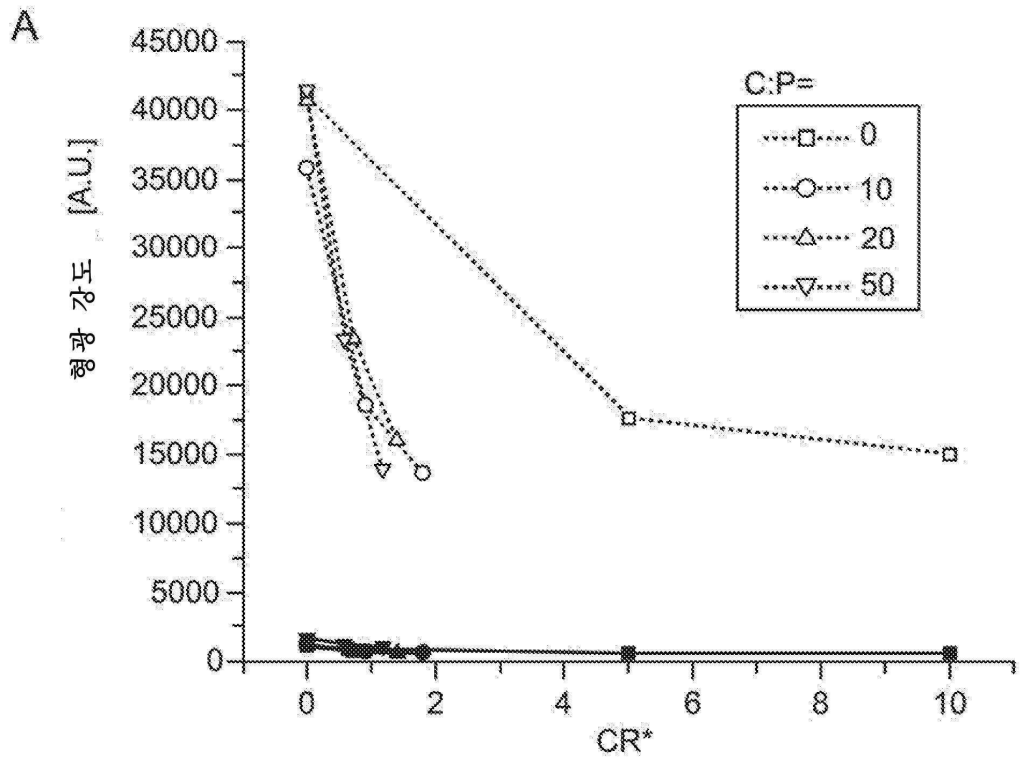
도면17


TRIS (pH=7.3) 중의 Cy5-EGFP mRNA
형광 강도 [A.U.]
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
2
4
6
8
10
CR
0
10
20
50

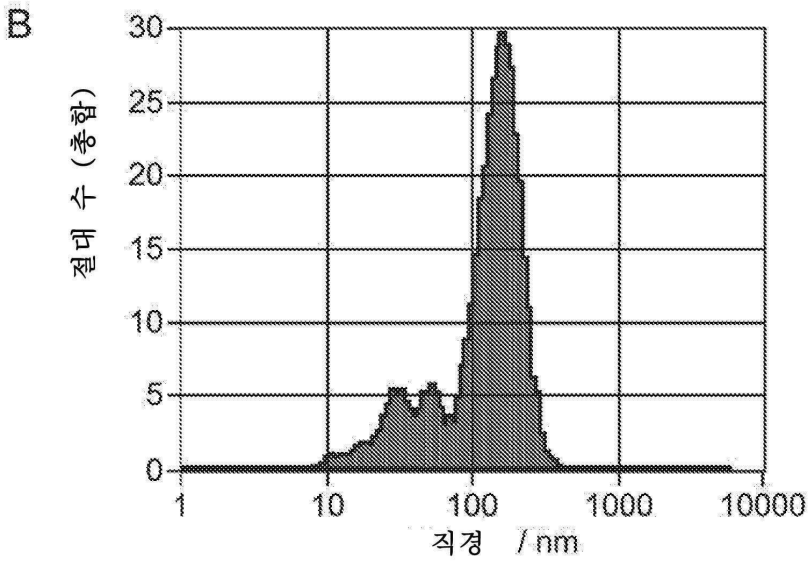
도면18


AF555-siRNA
형광 강도 [A.U.]
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
0
2
4
6
8
10
CR
C:P=
10
50
20
0

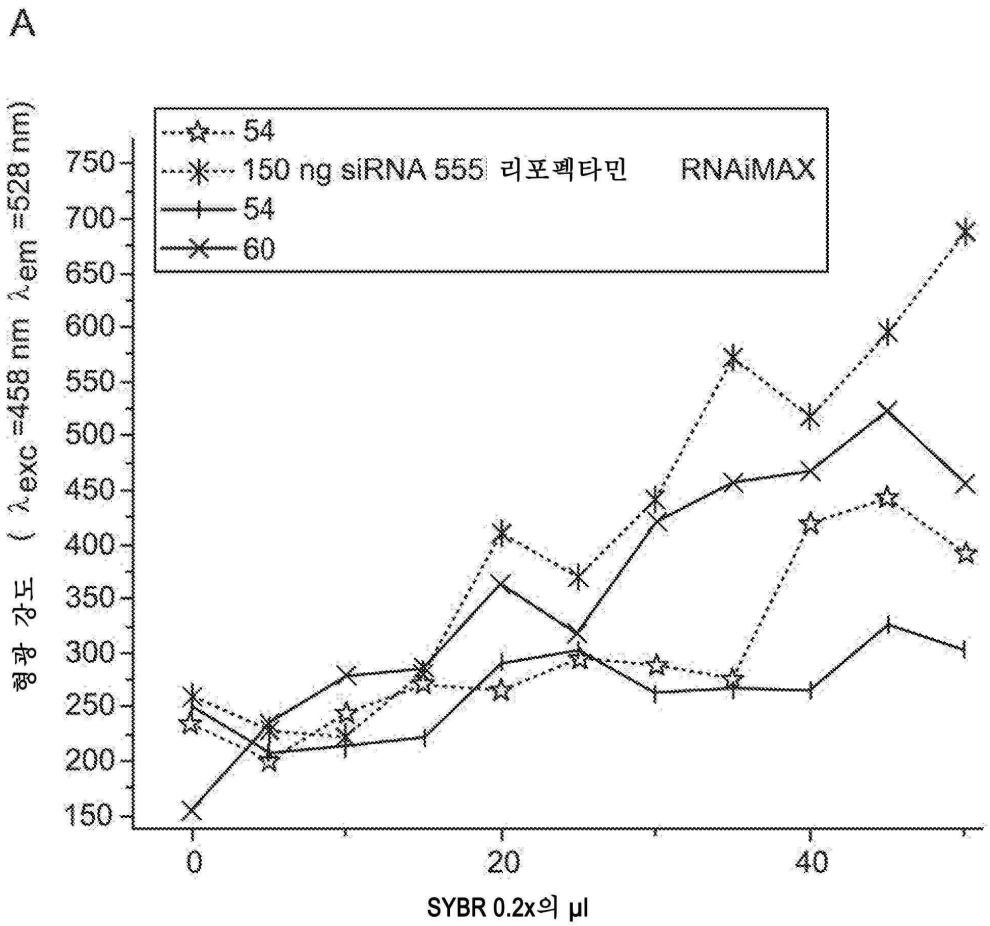
도면19a


A
형광 강도 [A.U.]
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
2
4
6
8
10
CR*
C:P=
0
10
20
50

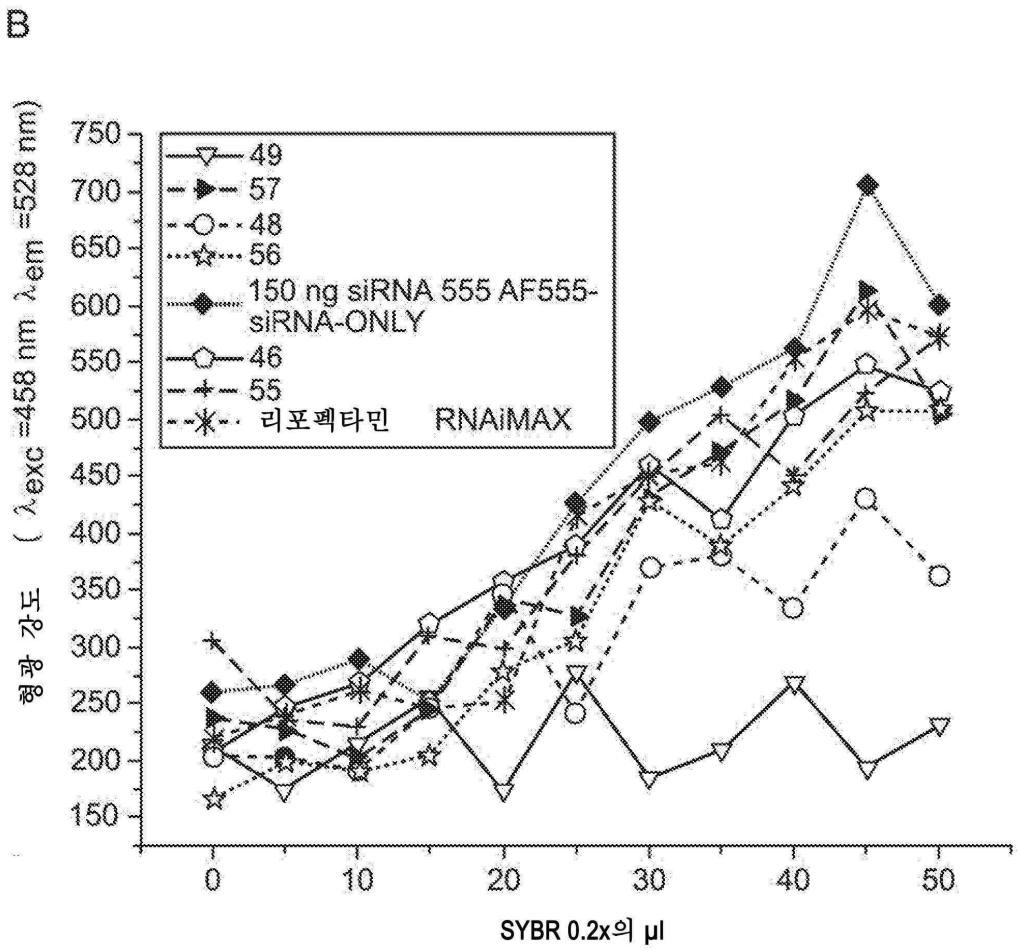
도면19b


B
절대 수 (총합)
30
25
20
15
10
5
0
1
10
100
1000
10000
직경 / nm

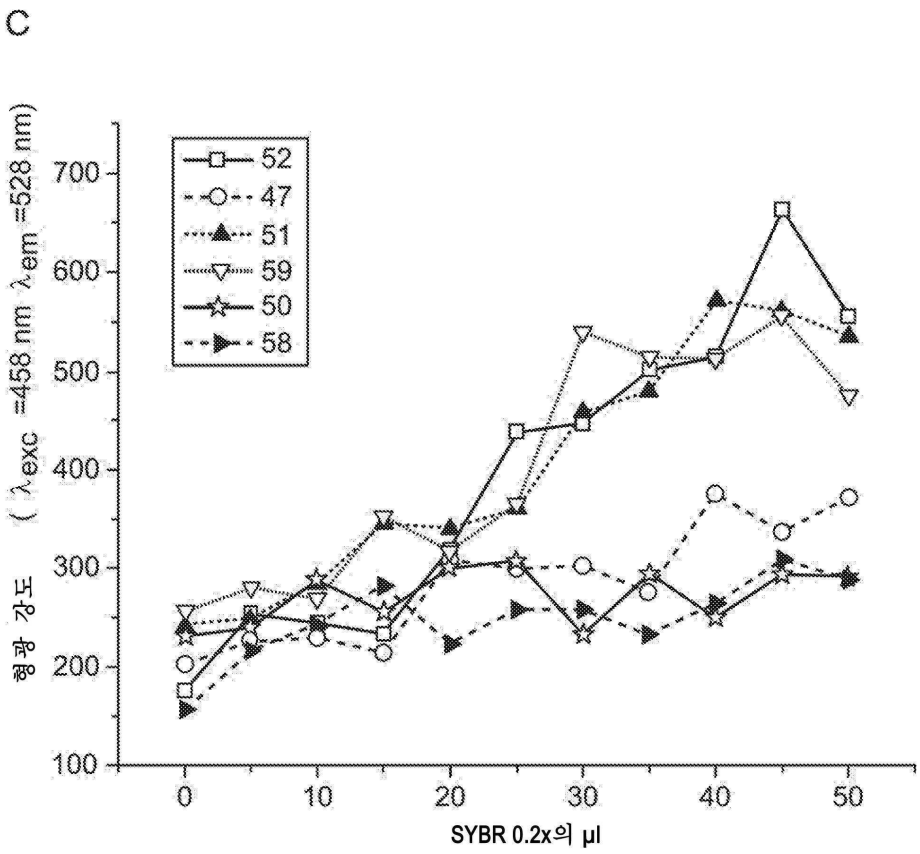
도면20a


A
54
150 ng siRNA 555 리포펙타민 RNAiMAX
54
60
형광 강도 (λexc =458 nm λem =528 nm)
750
700
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
0
20
40
SYBR 0.2x의 μl

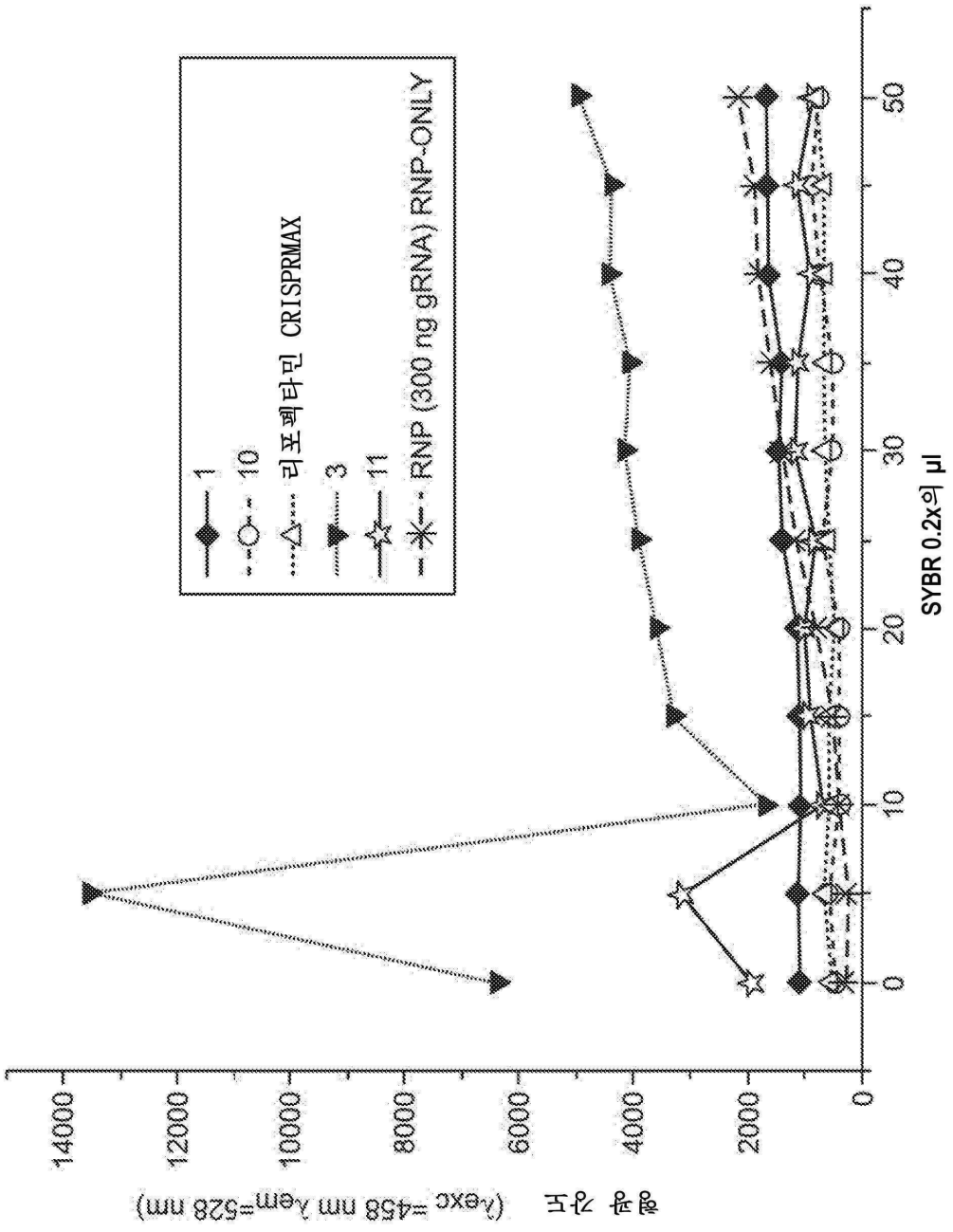
도면20b


B
형광 강도 (λexc =458 nm λem =528 nm)
750
700
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
0
10
20
30
40
50
SYBR 0.2x의 μl
49
57
48
56
150 ng siRNA 555 AF555-siRNA-ONLY
46
55
리포펙타민 RNAiMAX

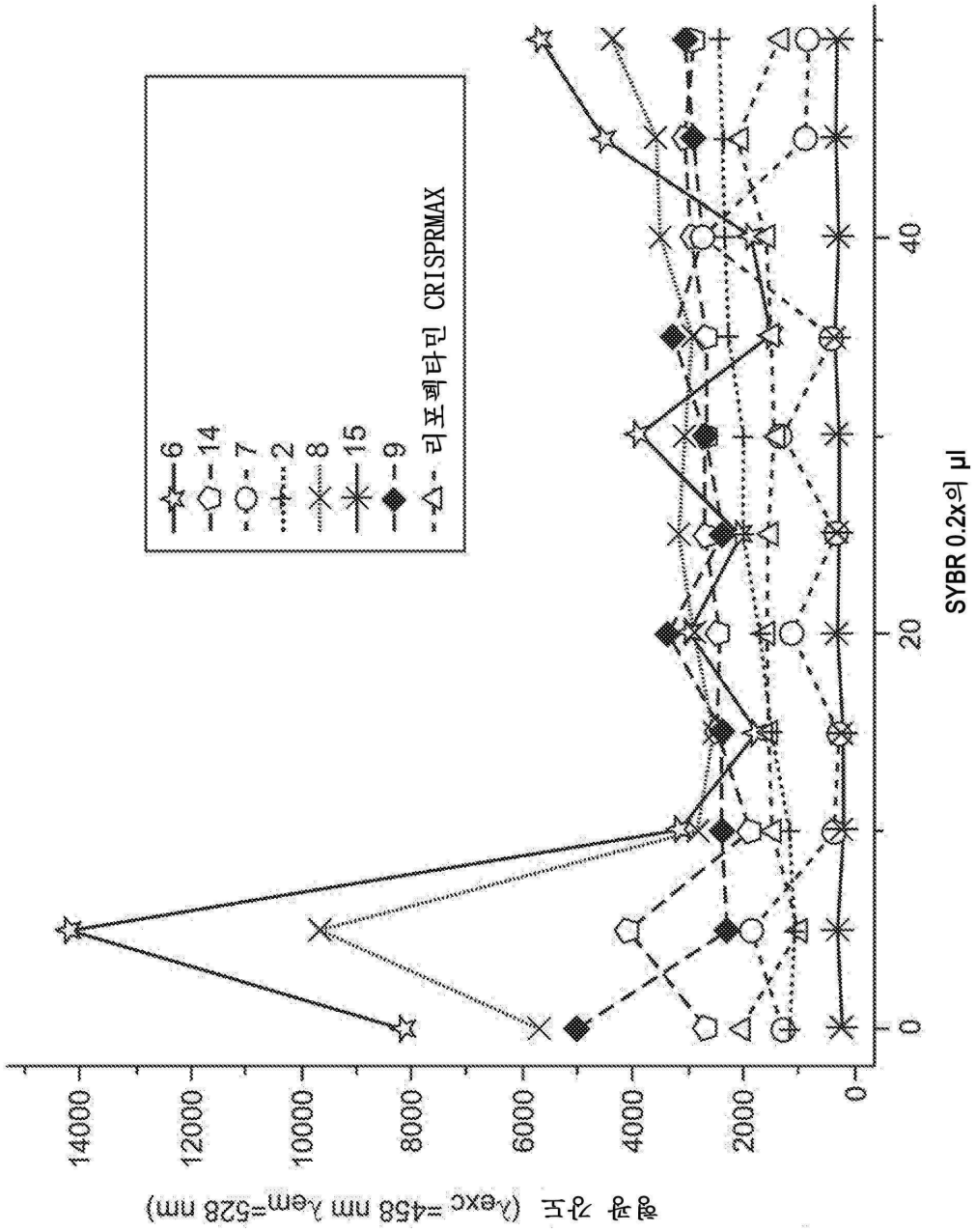
도면20c


C
형광 강도 (λexc =458 nm λem =528 nm)
700
600
500
400
300
200
100
0
10
20
30
40
50
SYBR 0.2x의 μl
52
47
51
59
50
58

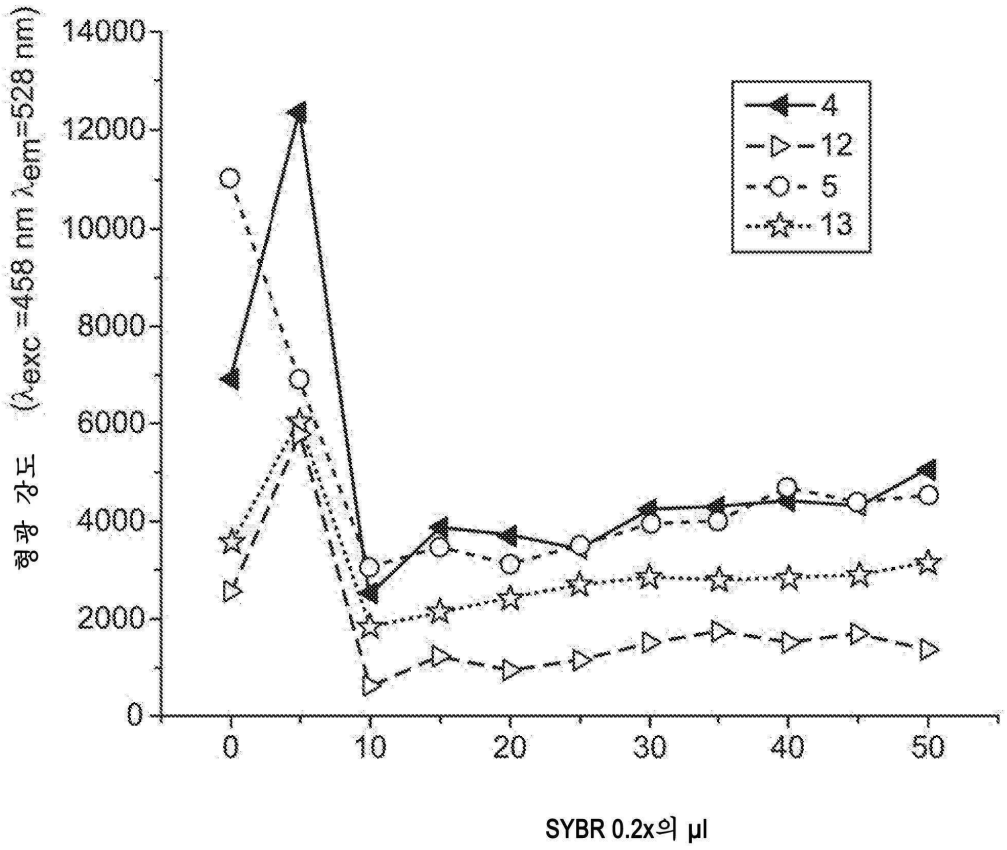
도면21a


형광 강도 (λexc =458 nm λem=528 nm)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
40
50
SYBR 0.2x의 μl
1
10
리포펙타민 CRISPRMAX
3
11
RNP (300 ng gRNA) RNP-ONLY

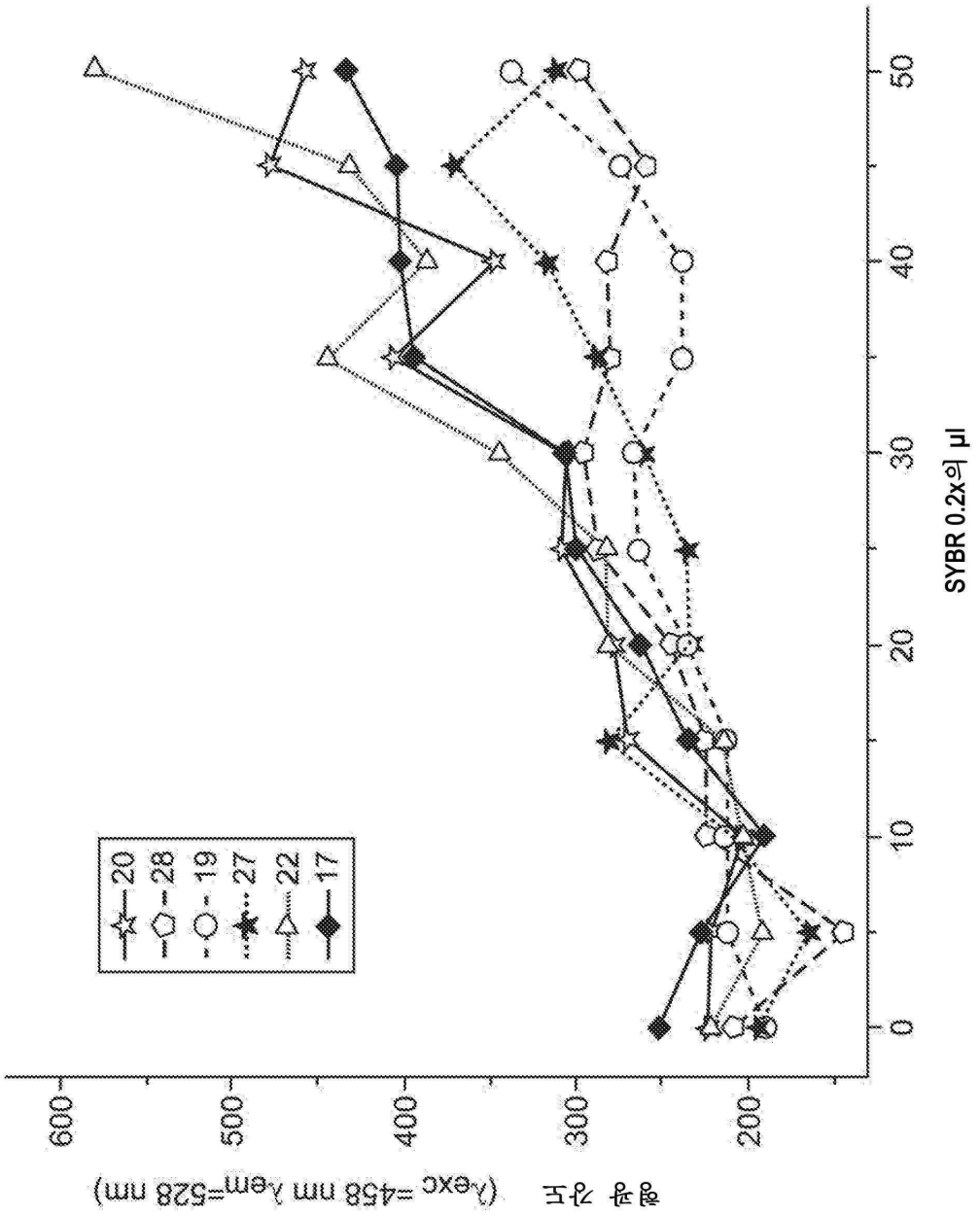
도면21b


형광 강도 (λexc =458 nm λem=528 nm)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
20
40
SYBR 0.2x의 μl
6
14
7
2
8
15
9
리포펙타민 CRISPRMAX

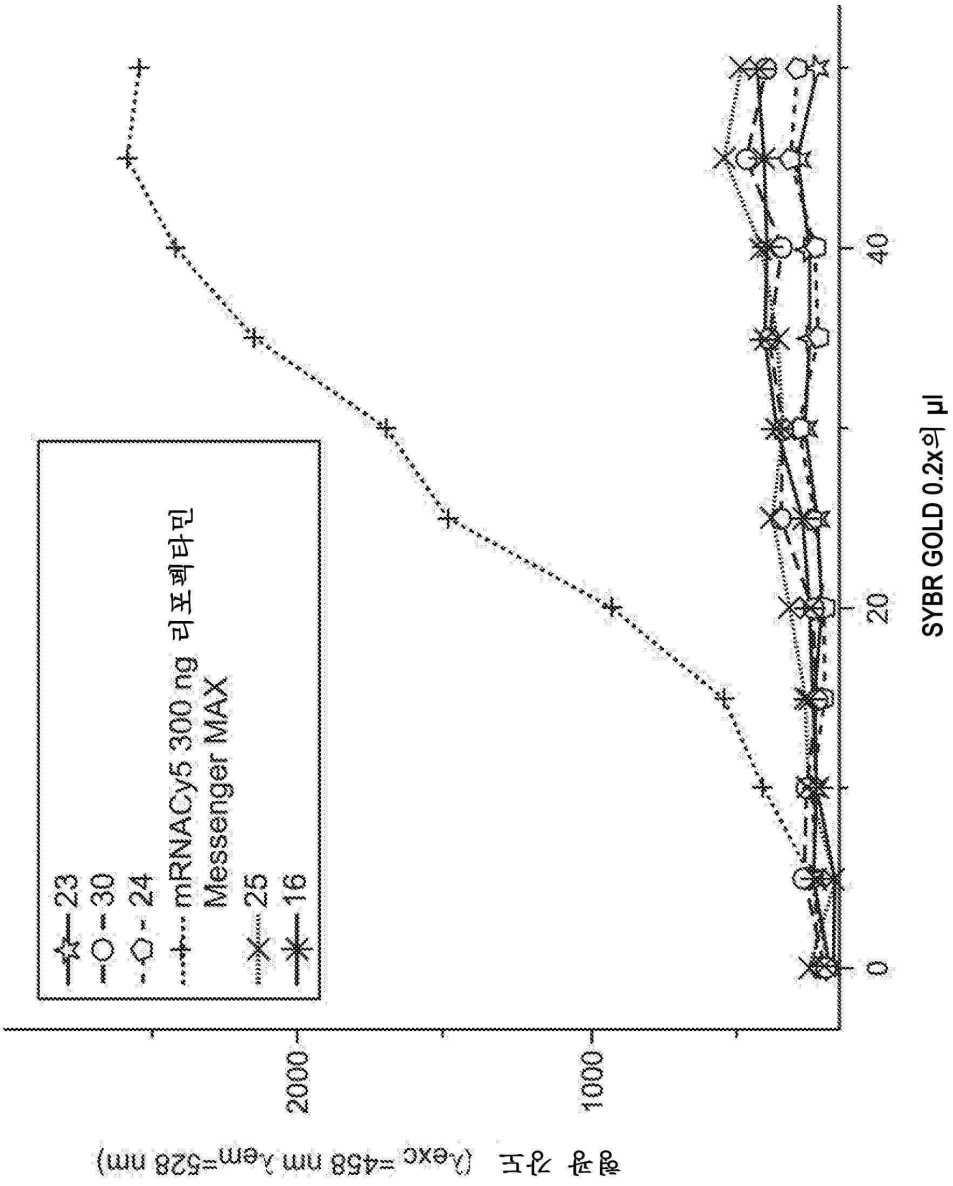
도면21c


형광 강도 (λexc =458 nm λem=528 nm)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
40
50
SYBR 0.2x의 μl
4
12
5
13

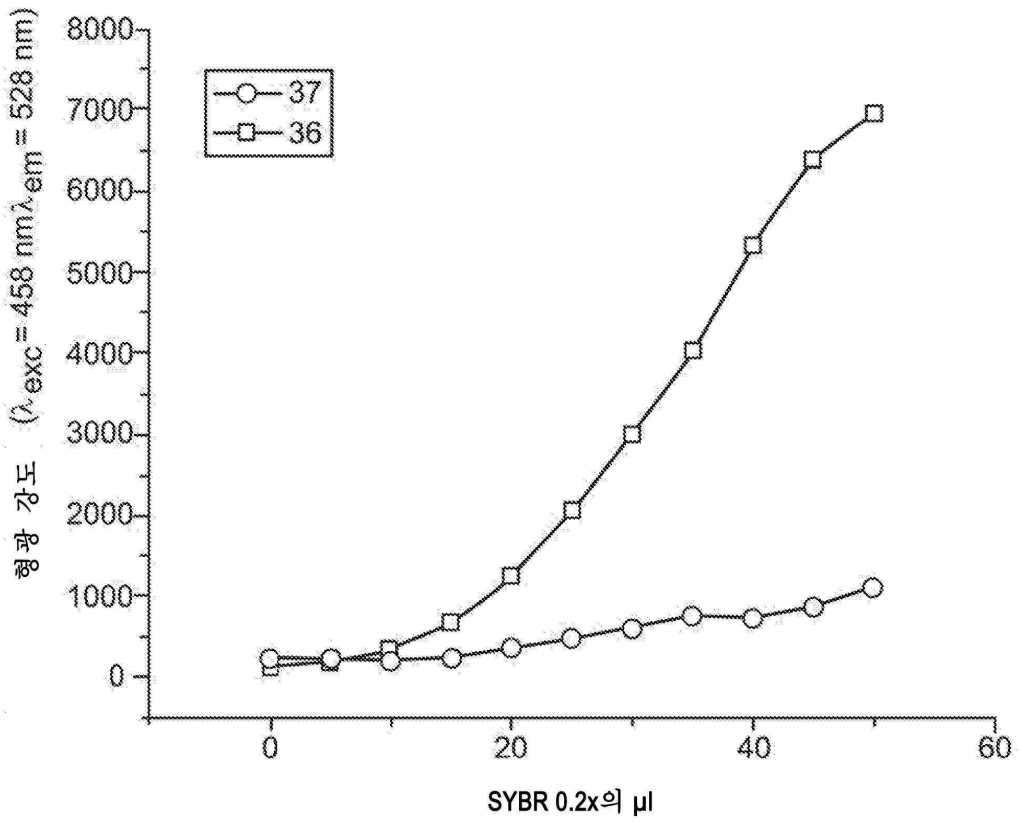
도면22a


형광 강도 (λexc =458 nm λem=528 nm)
600
500
400
300
200
0
10
20
30
40
50
SYBR 0.2x의 μl
20
28
19
27
22
17

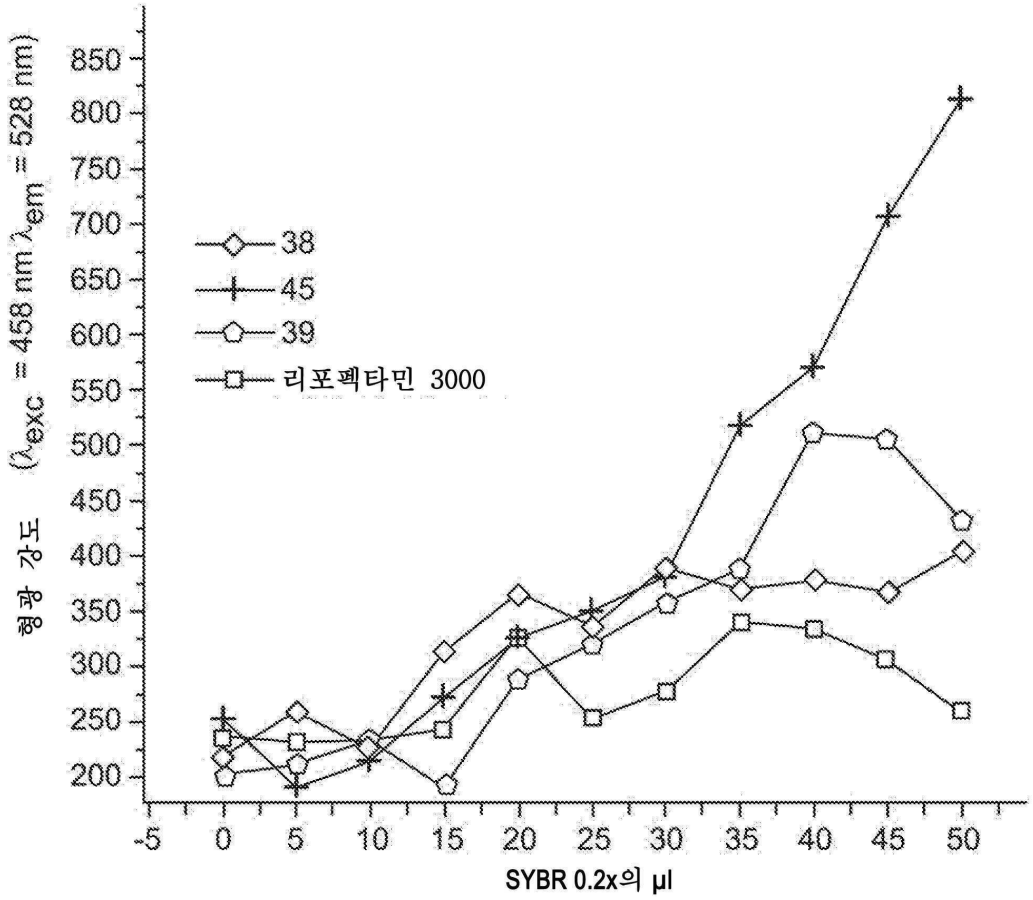
도면22b


형광 강도 (λexc =458 nm λem=528 nm)
2000
1000
0
20
40
SYBR GOLD 0.2x의 µl
23
30
24
mRNACy5 300 ng 리포펙타민 Messenger MAX
25
16

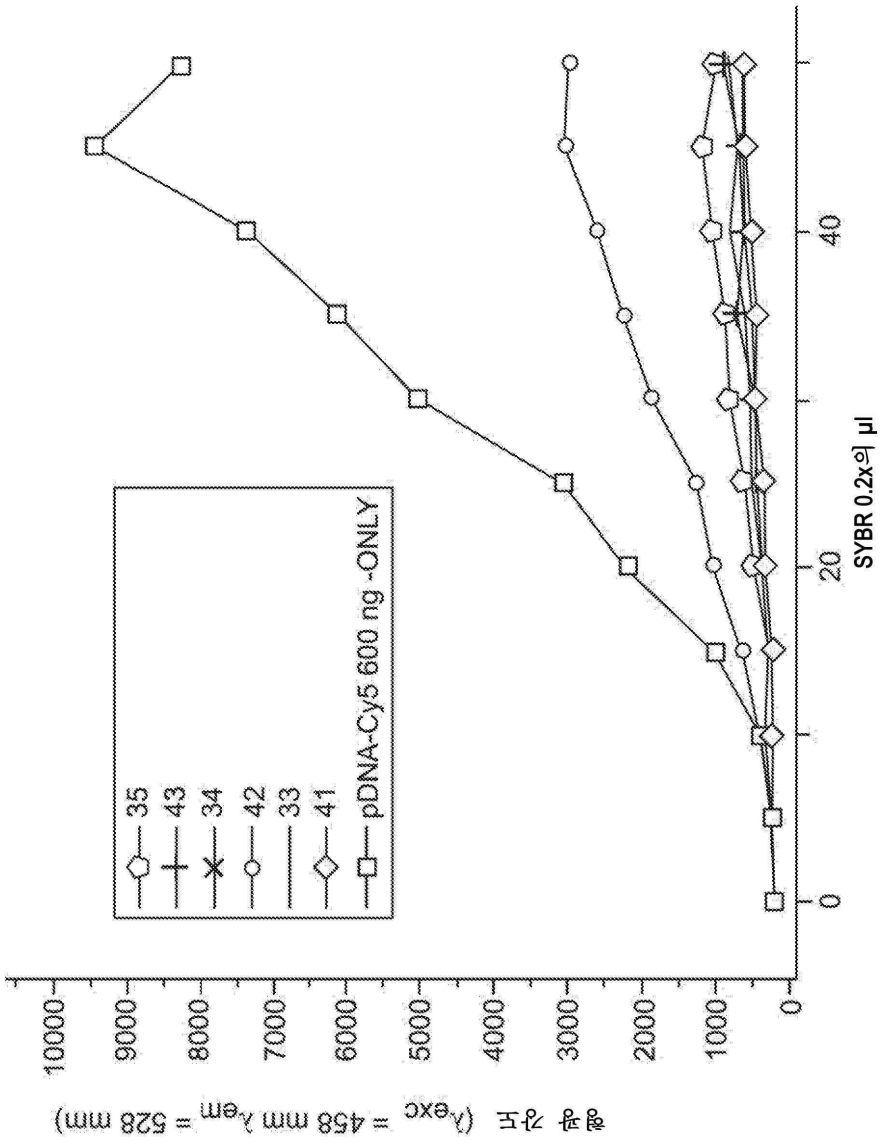
도면23a


형광 강도 (λ_{exc} = 458 nm λ_{em} = 528 nm)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
37
36
0
20
40
60
SYBR 0.2x의 μl

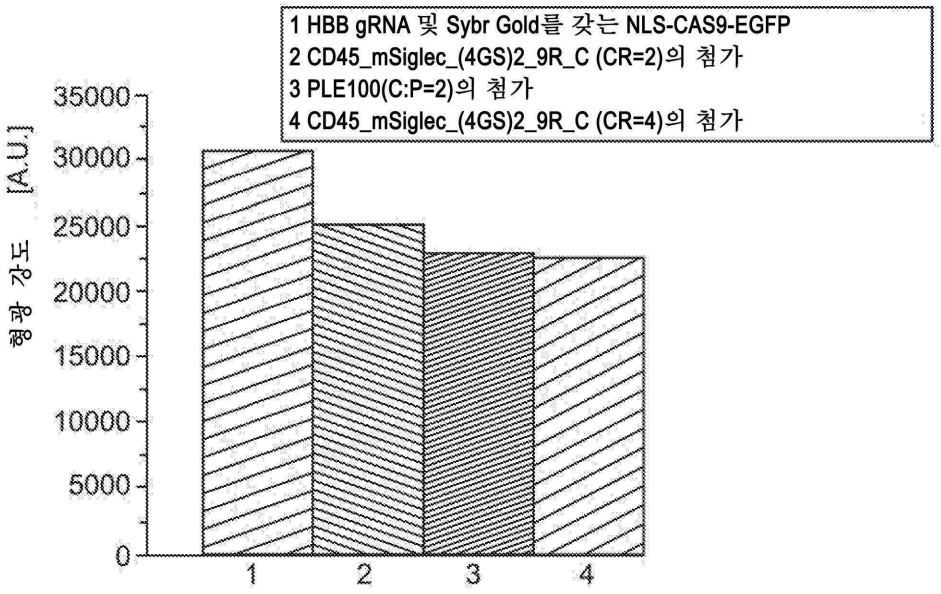
도면23b


형광 강도 (λ_{exc} = 458 nm λ_{em} = 528 nm)
850
800
750
700
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
38
45
39
리포펙타민 3000
-5
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
SYBR 0.2x의 μl

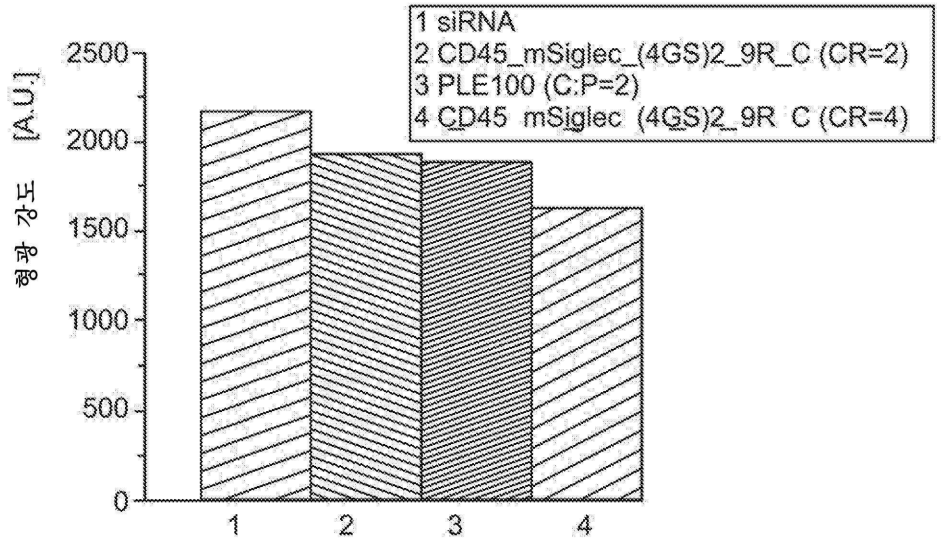
도면23c


형광 강도 (λ_{exc} = 458 mm λ_{em} = 528 mm)
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
20
40
SYBR 0.2x의 μl
pDNA-Cy5 600 ng -ONLY
41
33
42
34
43
35

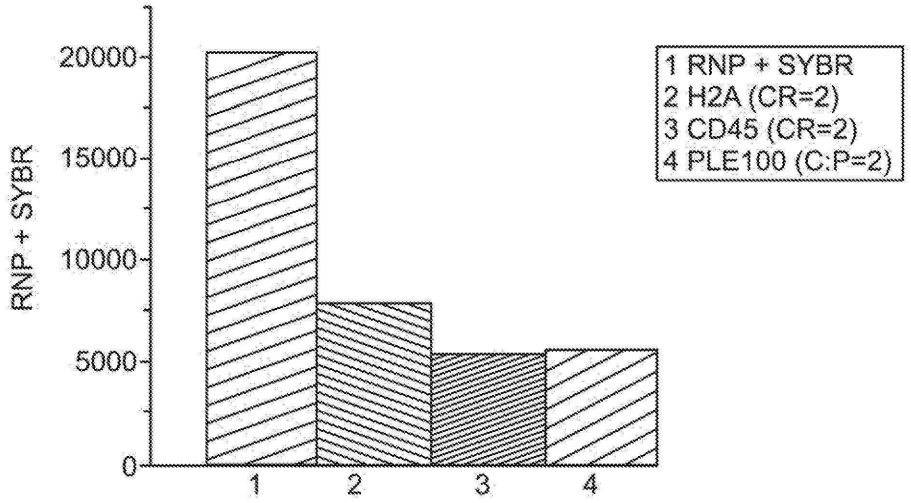
도면24


1 HBB gRNA 및 Sybr Gold를 갖는 NLS-CAS9-EGFP
2 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C (CR=2)의 첨가
3 PLE100(C:P=2)의 첨가
4 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C (CR=4)의 첨가
형광 강도 [A.U.]
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
1
2
3
4

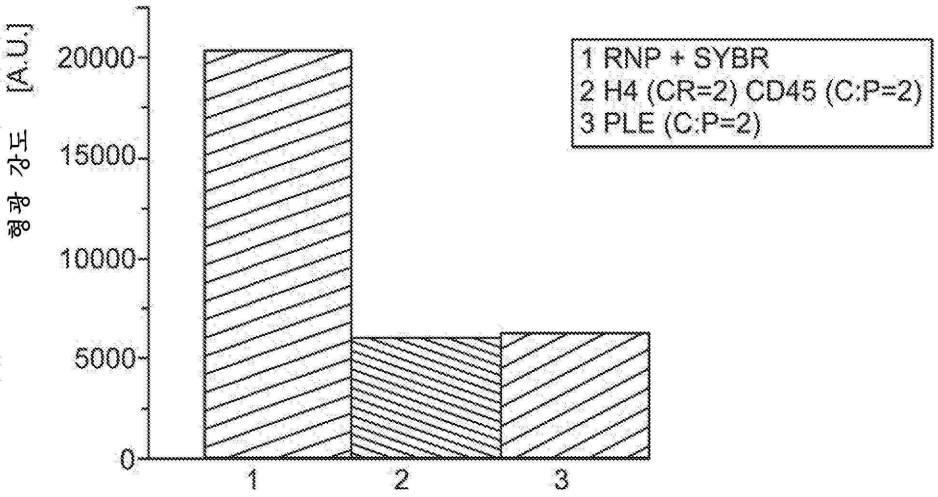
도면25


1 siRNA
2 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C (CR=2)
3 PLE100 (C:P=2)
4 CD45 mSiglec (4GS)2_9R C (CR=4)
형광 강도 [A.U.]
2500
2000
1500
1000
500
0
1
2
3
4

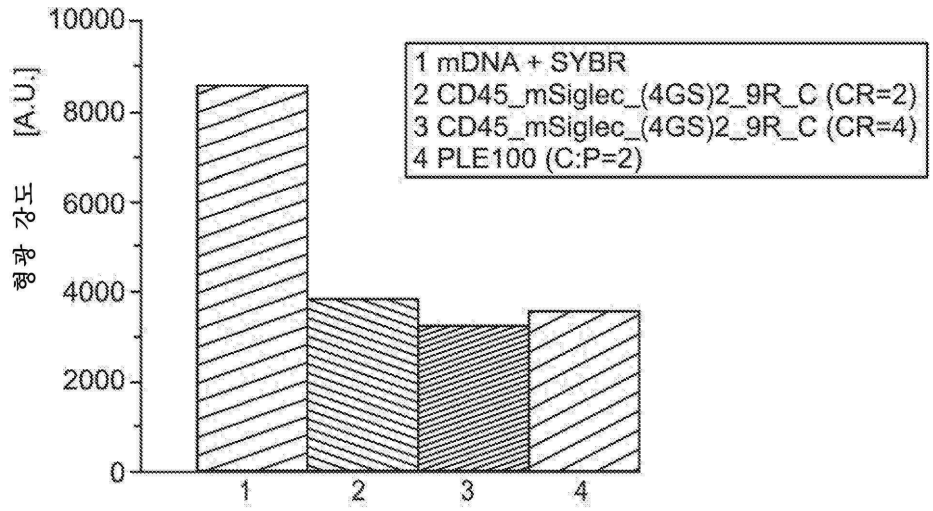
도면26



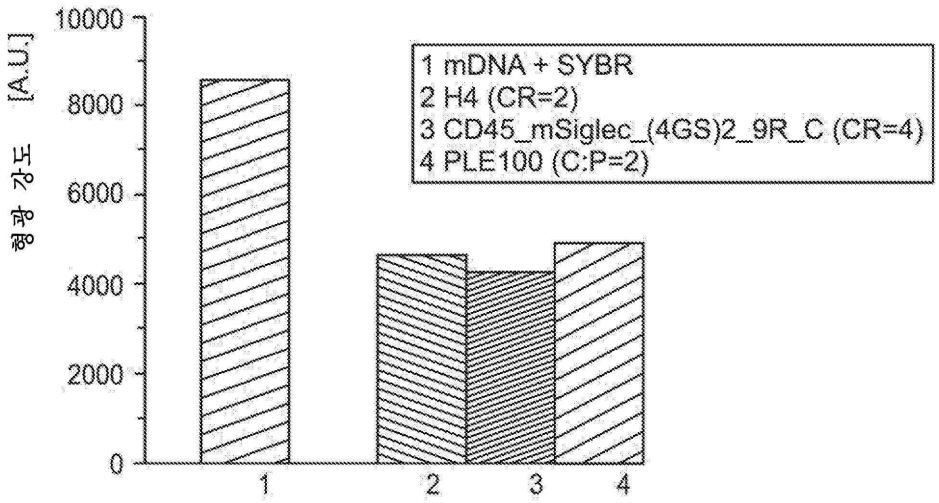
도면27



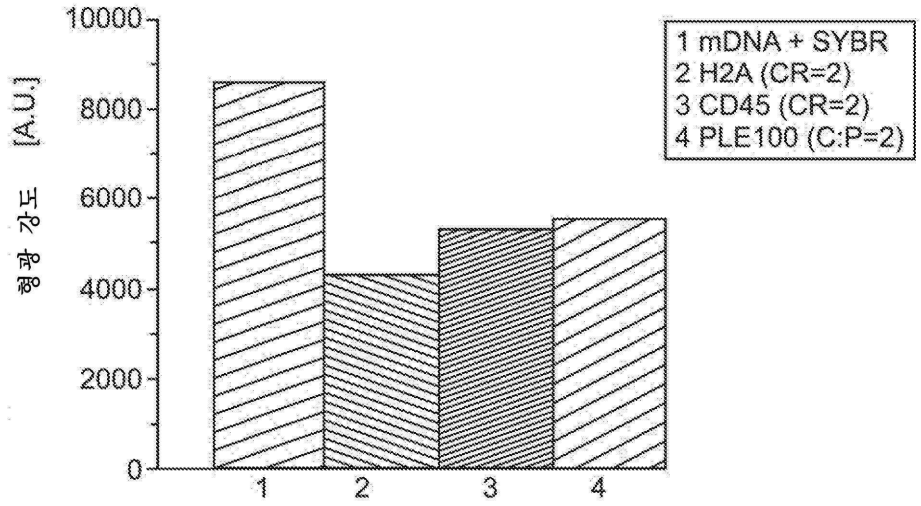
도면28



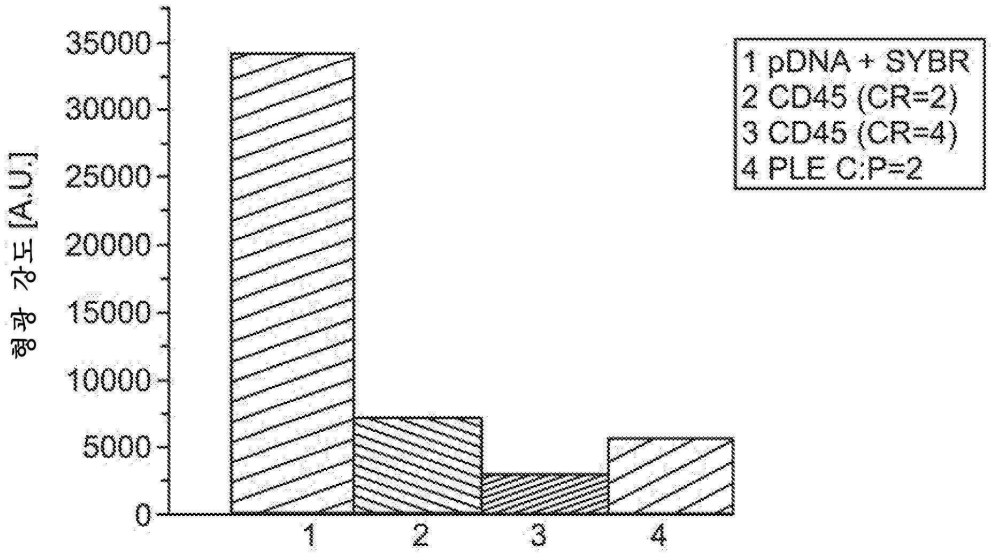
도면29


형광 강도 [A.U.]
10000
8000
6000
4000
2000
0
1
2
3
4
1 mDNA + SYBR
2 H4 (CR=2)
3 CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C (CR=4)
4 PLE100 (C:P=2)

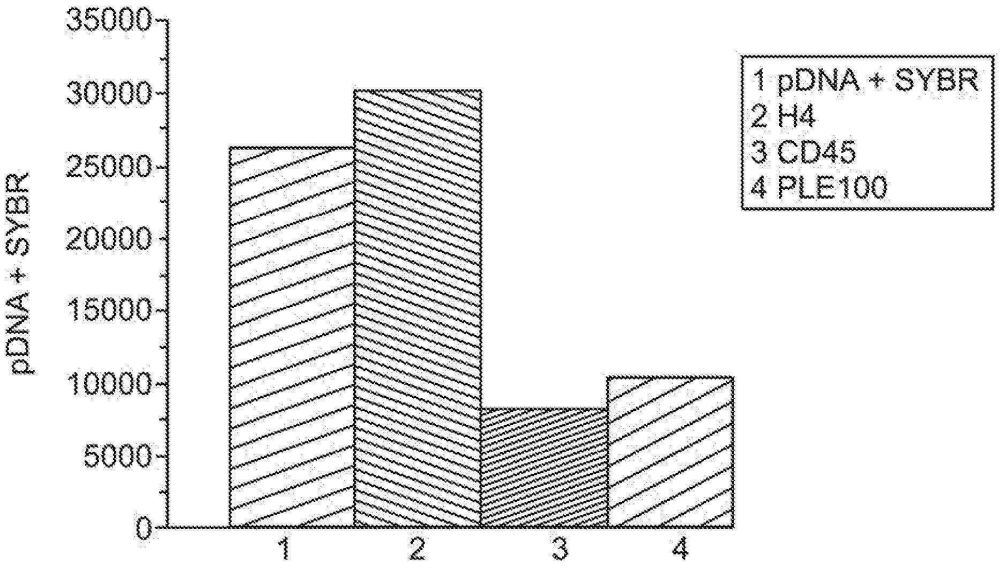
도면30


형광 강도 [A.U.]
10000
8000
6000
4000
2000
0
1
2
3
4
1 mDNA + SYBR
2 H2A (CR=2)
3 CD45 (CR=2)
4 PLE100 (C:P=2)

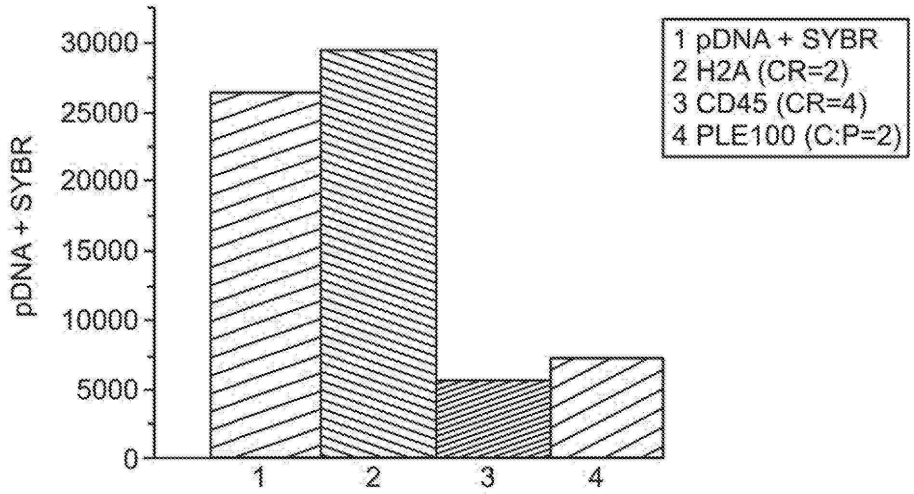
도면31


형광 강도 [A.U.]
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
1
2
3
4
1 pDNA + SYBR
2 CD45 (CR=2)
3 CD45 (CR=4)
4 PLE C:P=2

도면32

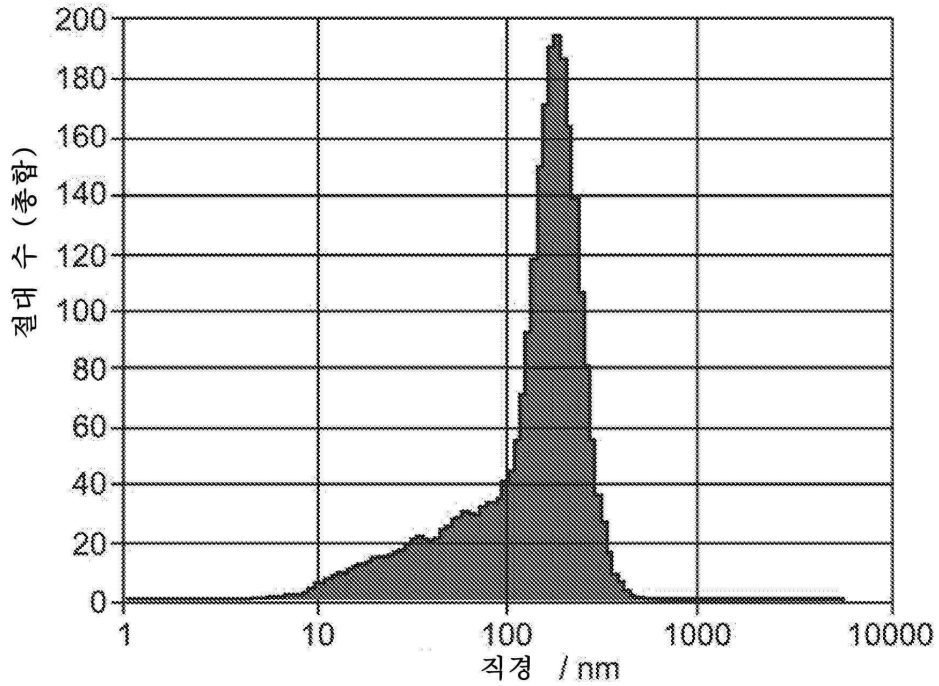

pDNA + SYBR
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
1
2
3
4
1 pDNA + SYBR
2 H4
3 CD45
4 PLE100

도면33


pDNA + SYBR
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
1
2
3
4
1 pDNA + SYBR
2 H2A (CR=2)
3 CD45 (CR=4)
4 PLE100 (C:P=2)

도면34a

A



피크 분석 (절대 수)

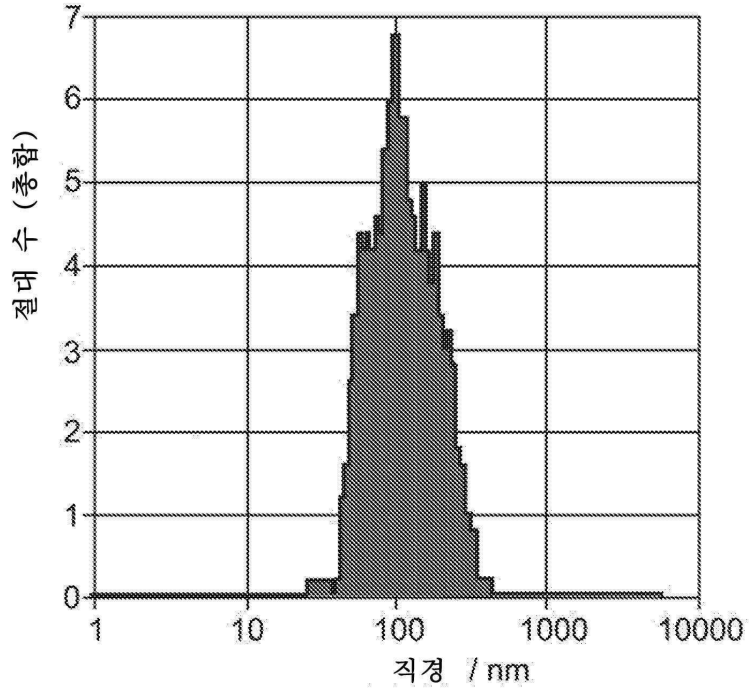
직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
181.0	194.4	116.0	100.0

X 값

	수	농도	부피
X10	34.7	34.7	152.3
X50	155.8	155.8	214.4
X90	232.1	232.1	314.7
너비	1.3	1.3	0.8
평균	151.5	151.5	233.4
표준편차	76.2	76.2	70.6

도면34ba

B



피크 분석 (절대 수)

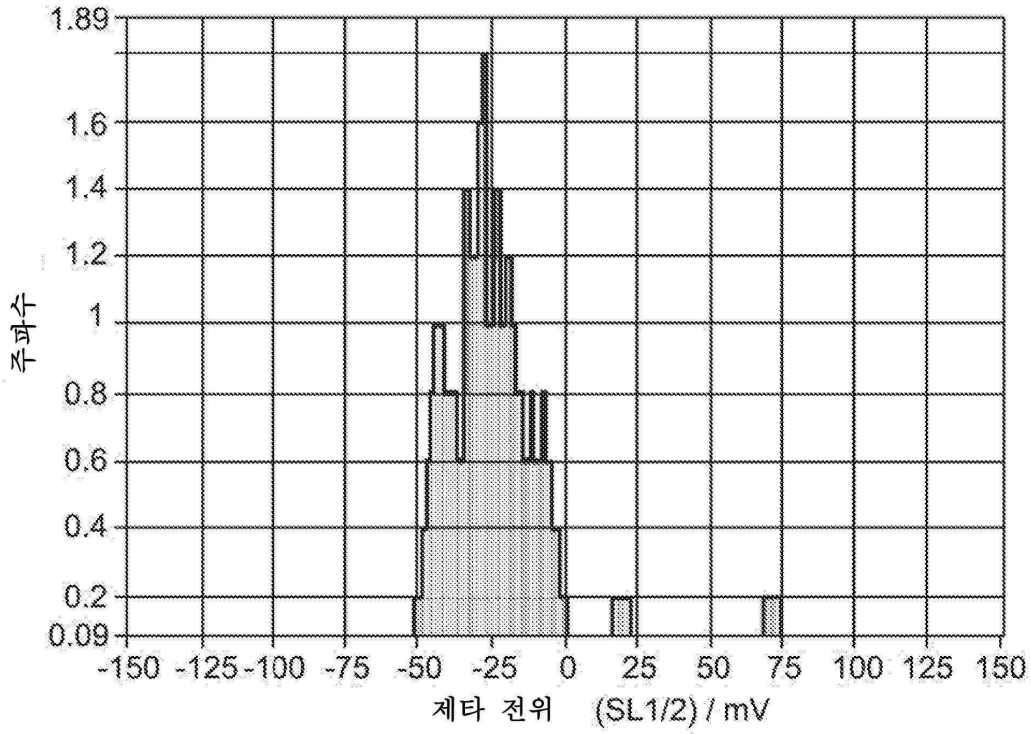
직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
100.0	6.6	143.6	100.0

X 값

	수	농도	부피
X10	54.9	54.9	115.8
X50	102.0	102.0	209.3
X90	207.8	207.8	343.7
너비	1.5	1.5	1.1
평균	124.5	124.5	226.6
표준편차	65.7	65.7	78.0

도면34bb

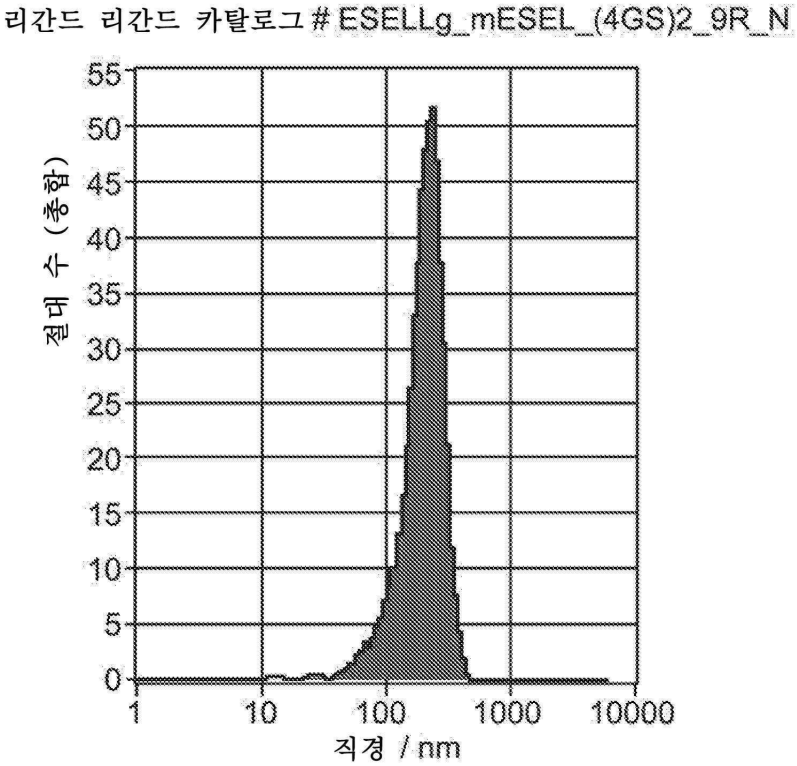
B



이동도: -1.72 ± 0.04 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1.72 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 12.8 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -21.98 ± 0.51 mV
제타 전위 분포: -21.98 mV FWHM 16.96 (SL1/2)

도면34ca

C



피크 분석 (절대 수)

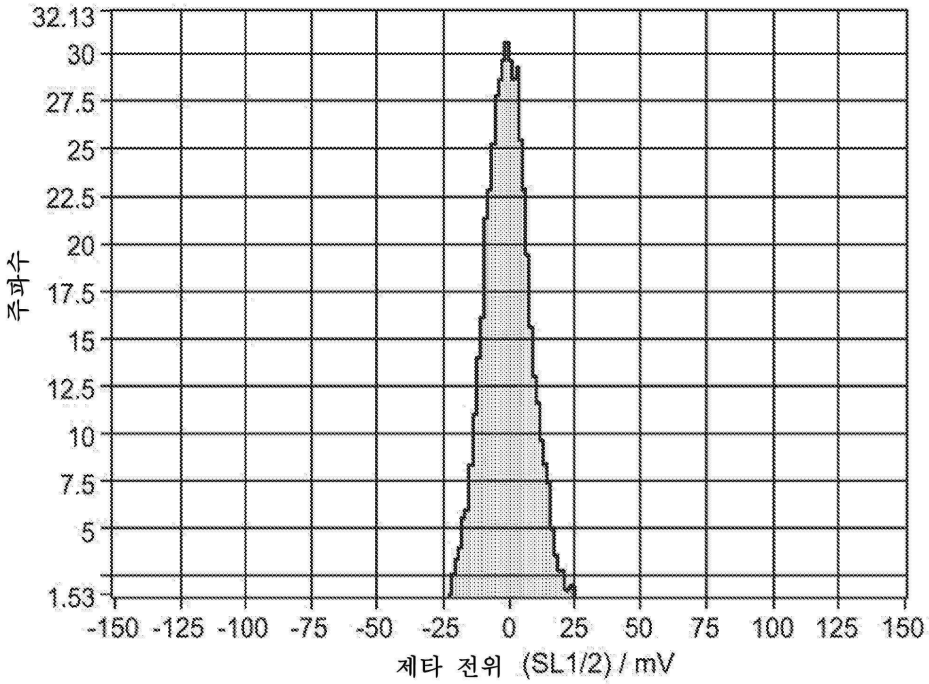
직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
224.4	50.2	149.2	100.0

X 값

	수	농도	부피
X10	110.9	110.9	182.7
X50	205.8	205.8	253.2
X90	279.9	279.9	333.5
너비	0.8	0.8	0.6
평균	209.3	209.3	263.1
표준편차	68.2	68.2	58.4

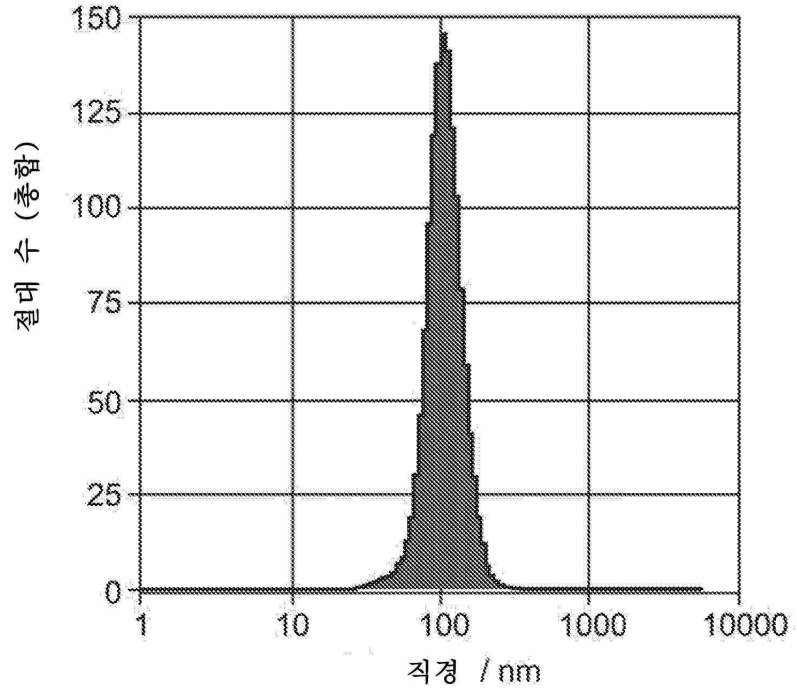
도면34cb

C



이동도: -0.03 ± 0.07 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.03 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 13.7 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -0.36 ± 0.96 mV
제타 전위 분포: -0.36 mV FWHM 21.36 (SL1/2)

도면35



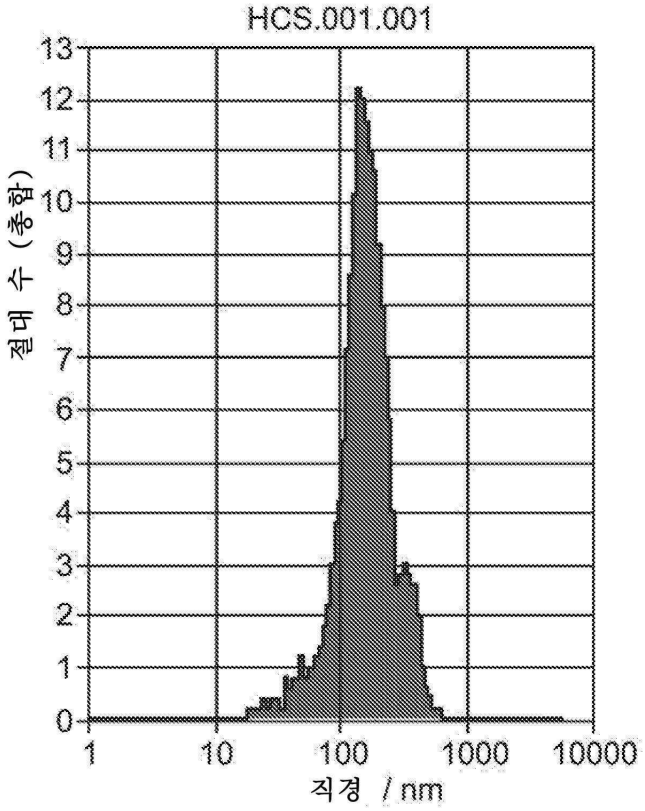
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
107.0	145.4	61.0	100.0

X 값

	수	농도	부피
X10	75.9	75.9	91.9
X50	103.2	103.2	124.5
X90	143.6	143.6	180.8
너비	0.7	0.7	0.7
평균	110.3	110.3	137.0
표준편차	29.6	29.6	40.4

도면36a



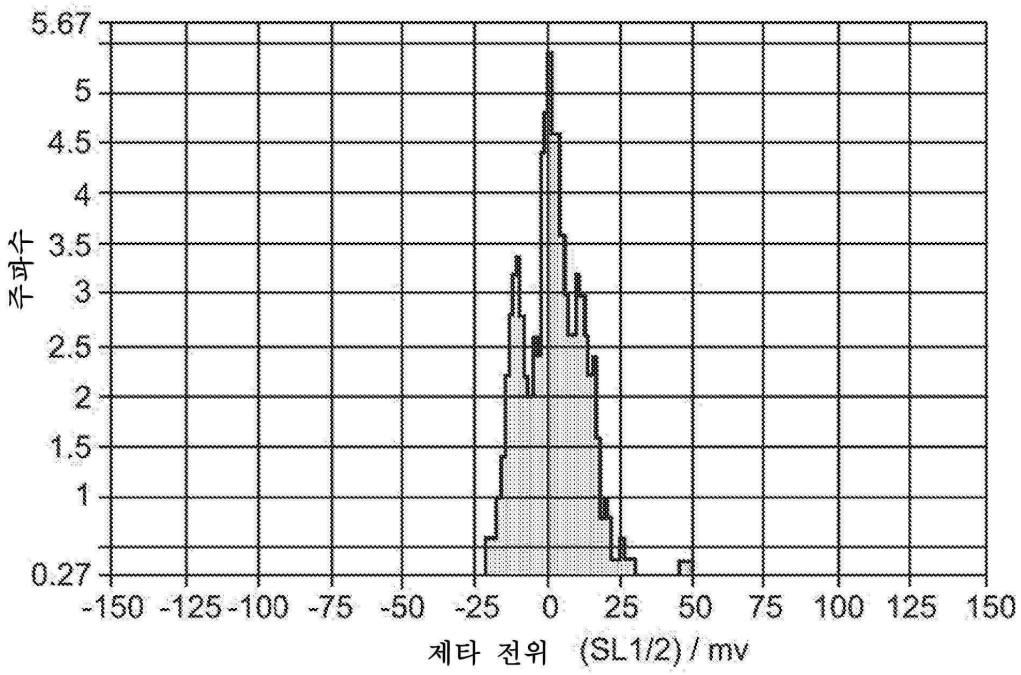
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
156.6	11.7	129.3	100.0

X 값

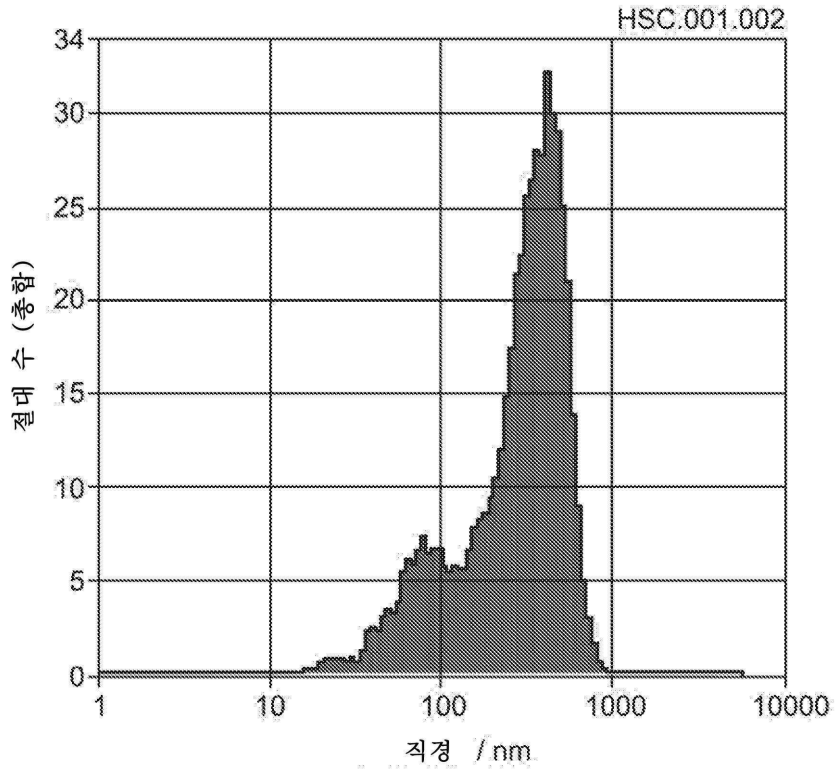
	수	농도	부피
X10	82.2	82.2	153.2
X50	150.9	150.9	319.1
X90	277.0	277.0	440.7
너비	1.3	1.3	0.9
평균	173.5	173.5	308.2
표준편차	85.6	85.6	112.7

도면36b

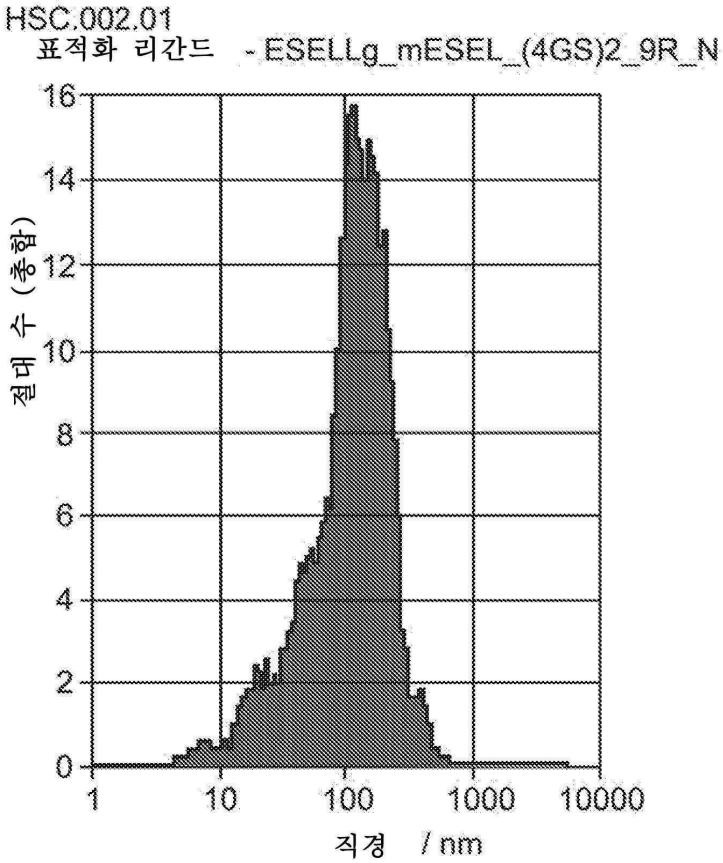


이동도: 0.31 ± 0.07 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.33 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 13.6 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: 4.18 ± 0.93 mV
제타 전위 분포: 4.18 mV FWHM 10.97 (SL1/2)

도면37



도면38a



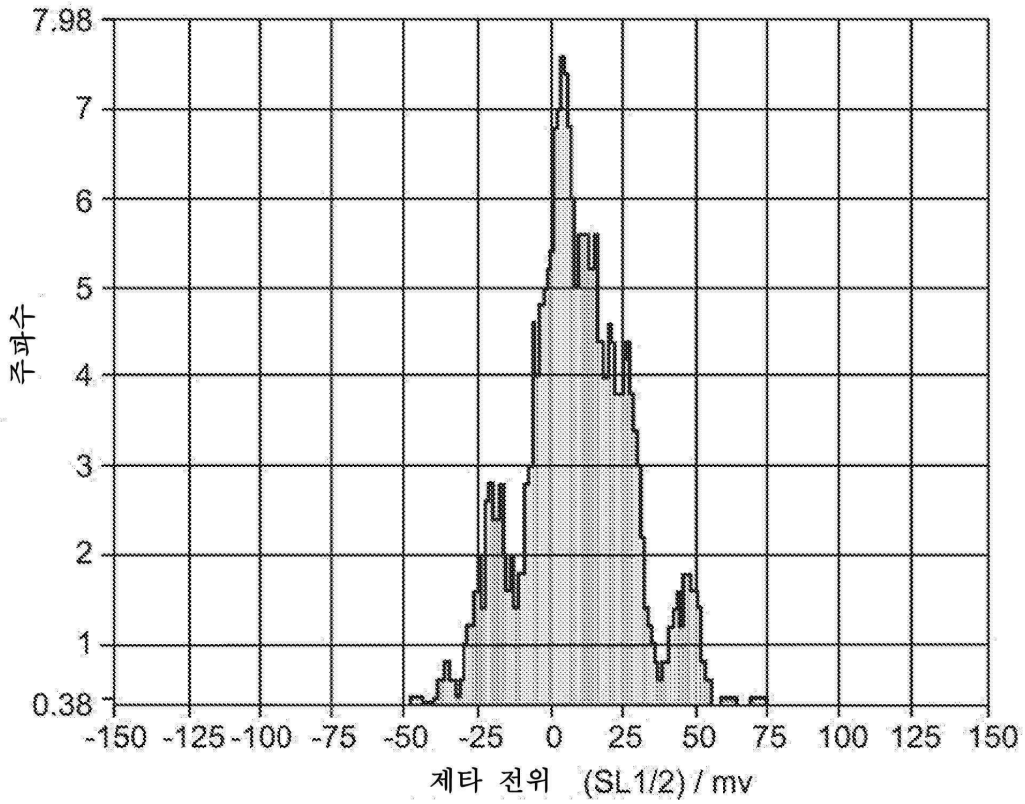
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
127.3	14.9	161.8	100.0

X 값

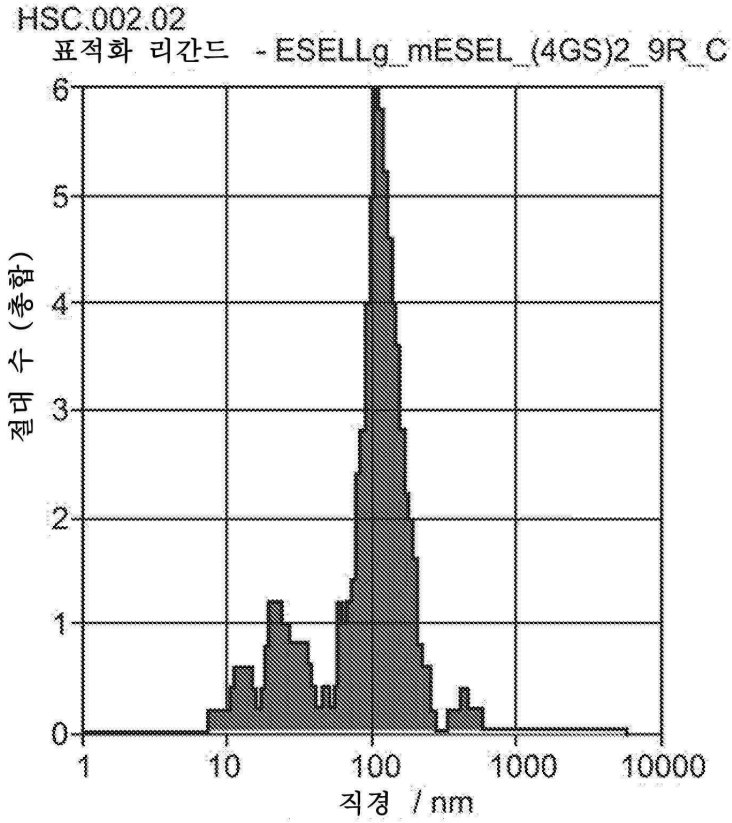
	수	농도	부피
X10	31.3	31.3	137.3
X50	109.8	109.8	245.7
X90	217.7	217.7	448.7
너비	1.7	1.7	1.3
평균	126.7	126.7	288.4
표준편차	81.3	81.3	130.0

도면38b



이동도:	0.88 ± 0.05 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.85 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 12.5 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: 10.90 ± 0.58 mV
제타 전위 분포:	10.90 mV FWHM 22.10 (SL1/2)

도면39a



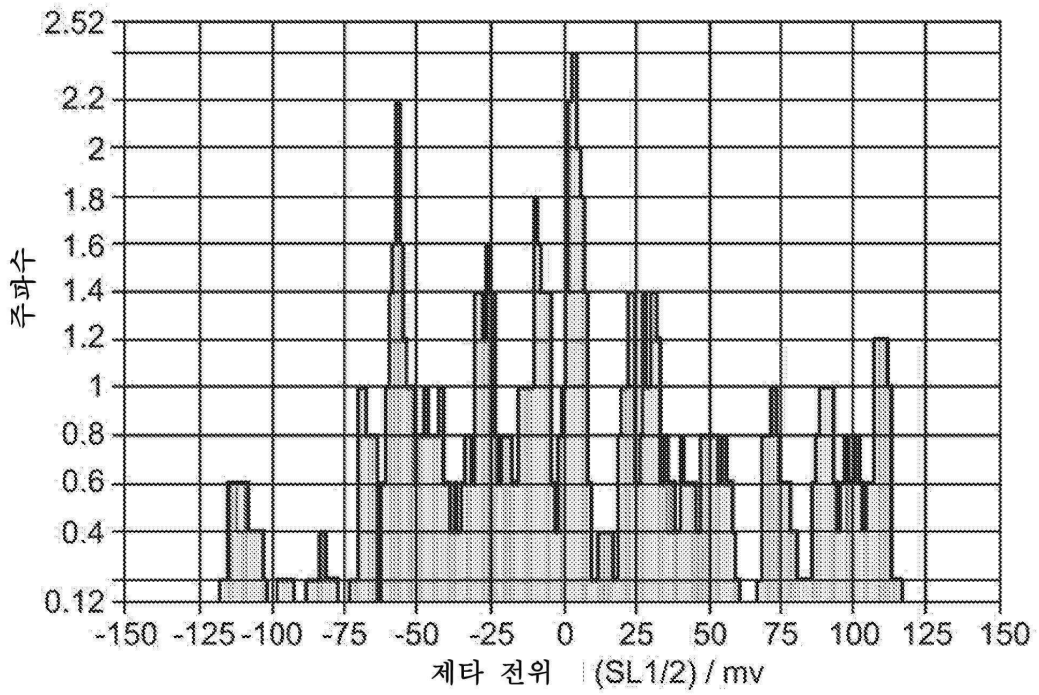
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
114.6	5.7	70.3	80.0
23.9	1.1	19.3	20.0

X 값

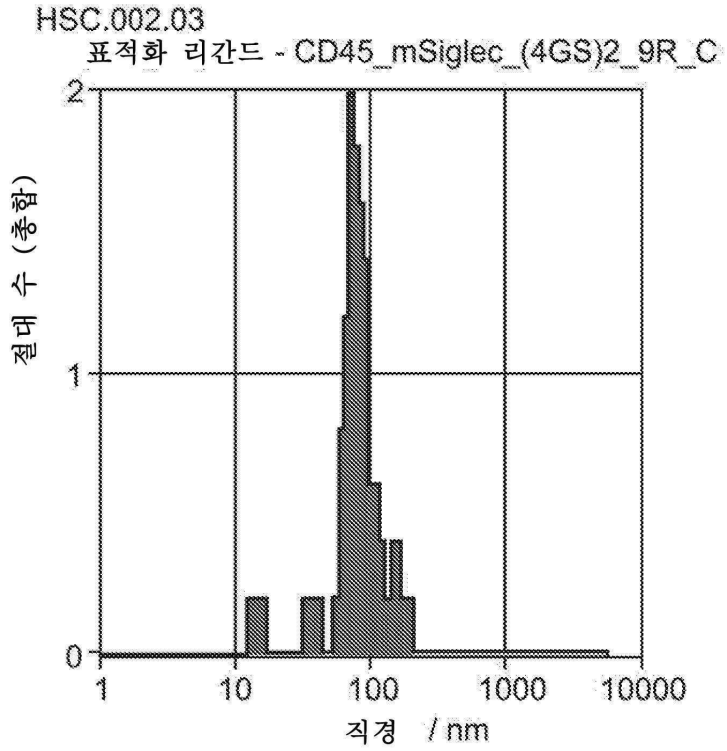
	수	농도	부피
X10	21.4	21.4	114.4
X50	102.0	102.0	373.5
X90	166.0	166.0	473.5
너비	1.4	1.4	1.0
평균	108.9	108.9	319.5
표준편차	74.5	74.5	153.6

도면39b



제타 전위	@ 25° C: -7.10 ± 0.30 mV
제타 전위 분포:	-7.10 mV FWHM 6.49 (SL1/2)
농도:	6.7E+7 입자 / mL
희석 인자: 1	
원래 농도:	6.7E+7 입자 / cm^3

도면40a



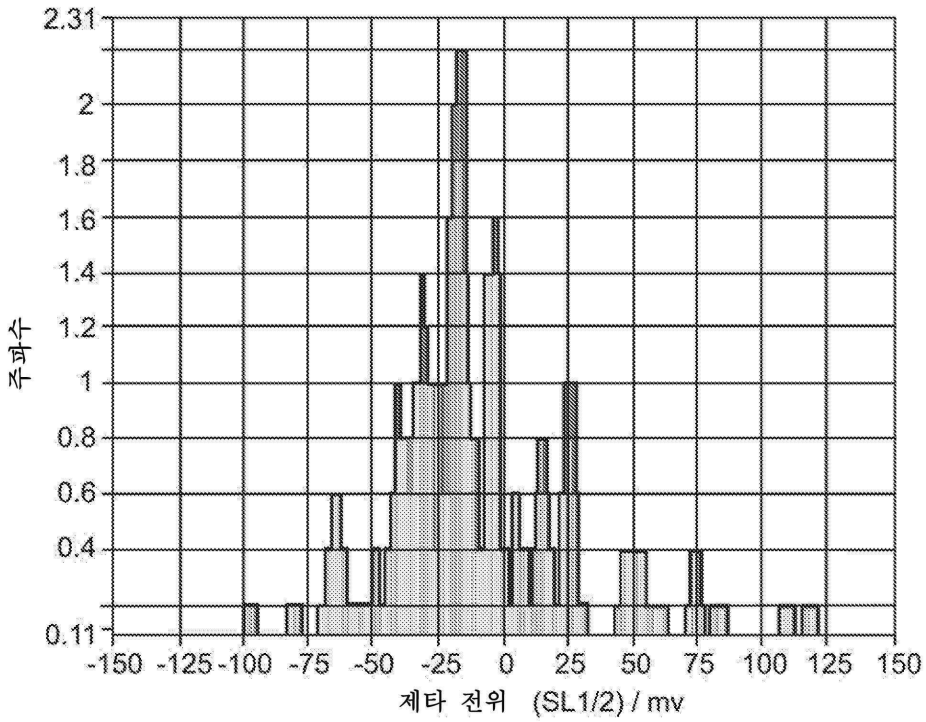
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
78.2	1.8	32.3	100.0

X 값

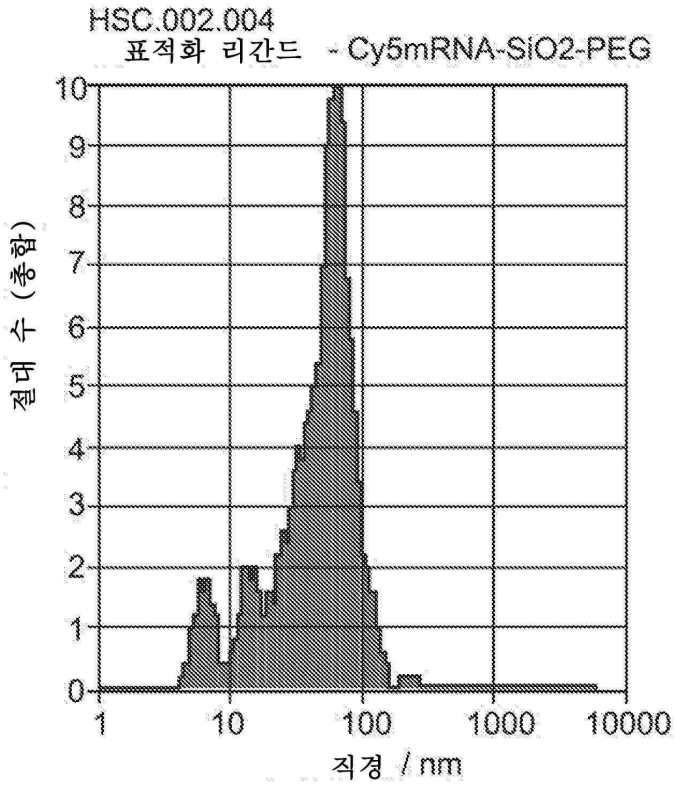
	수	농도	부피
X10	36.7	36.7	70.9
X50	75.4	75.4	130.6
X90	132.6	132.6	167.8
너비	1.3	1.3	0.7
평균	82.6	82.6	124.1
표준편차	35.3	35.3	42.6

도면40b



이동도: -0.33 ± 0.03 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.32 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 12.5 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -4.11 ± 0.38 mV
제타 전위 분포: -4.11 mV FWHM 6.33 (SL1/2)

도면41a



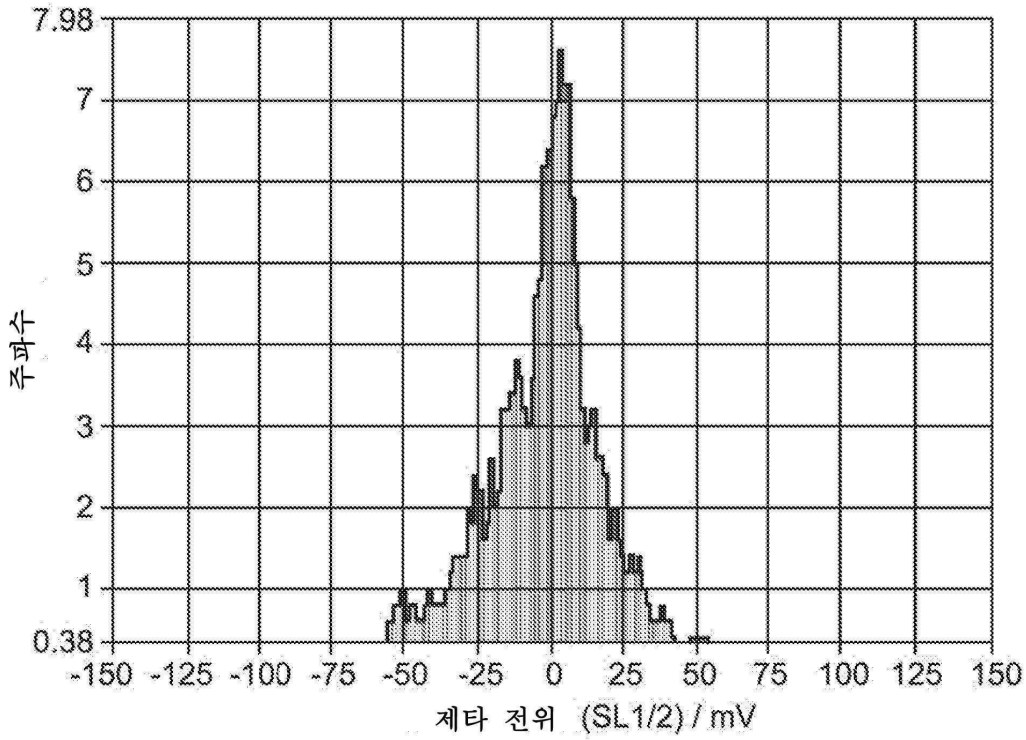
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
60.8	9.8	40.9	83.8
15.2	2.0	5.9	8.7
6.3	1.6	2.9	7.5

X 값

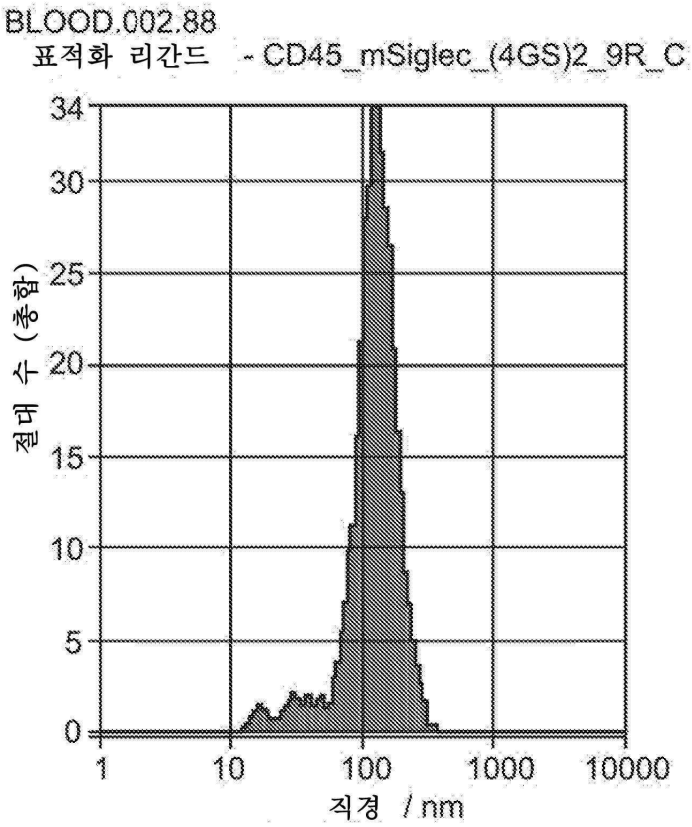
	수	농도	부피
X10	12.2	12.2	54.9
X50	50.5	50.5	90.0
X90	79.6	79.6	219.1
너비	1.3	1.3	1.8
평균	51.1	51.1	117.2
표준편차	31.0	31.0	64.8

도면41b



이동도: -0.15 ± 0.05 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.15 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 12.4 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -1.86 ± 0.58 mV
제타 전위 분포: -1.86 mV FWHM 15.86 (SL1/2)

도면42a



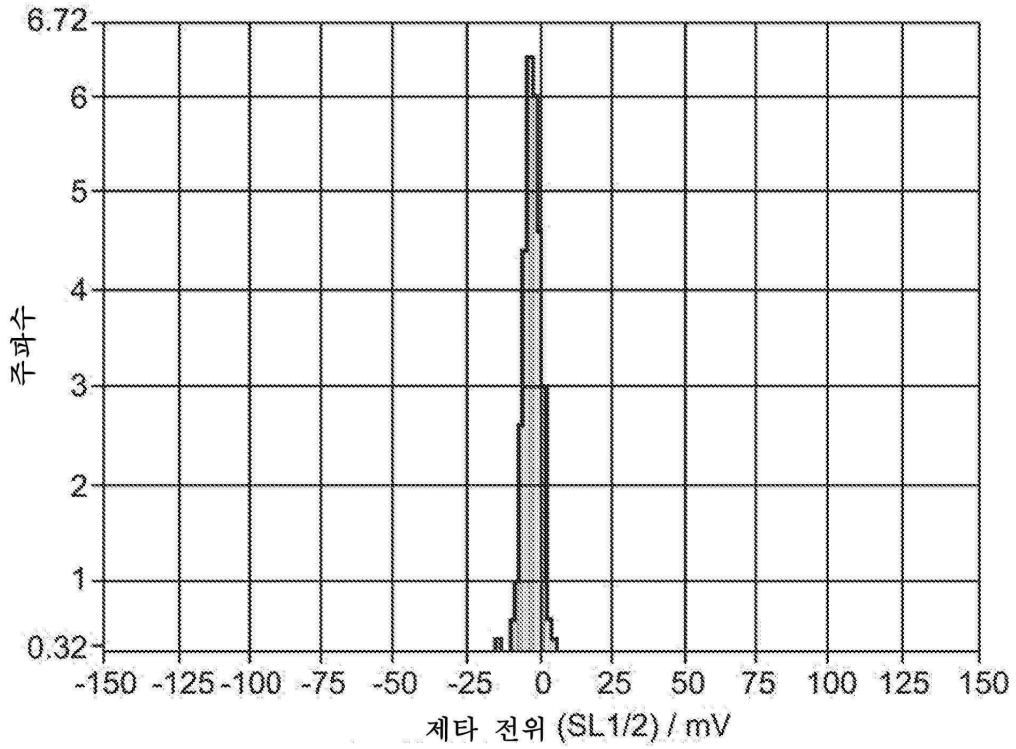
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
129.1	34.0	88.1	100.0

X 값

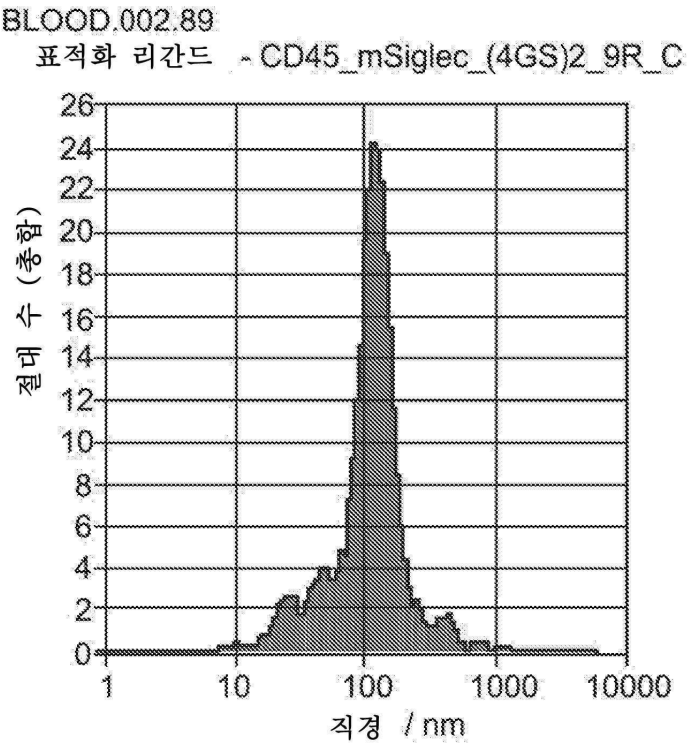
	수	농도	부피
X10	69.0	69.0	111.6
X50	120.1	120.1	164.4
X90	179.8	179.8	246.4
너비	0.9	0.9	0.8
평균	128.4	128.4	177.9
표준편차	48.5	48.5	53.0

도면42b



이동도: -0.26 ± 0.02 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.26 µm/sec/V/cm ZP 인자: 12.8 (스몰루호프스키) 제타 전위 @ 25°C: -3.32 ± 0.29 mV 제타 전위 분포: -3.32 mV FWHM 7.13 (SL1/2)

도면43a



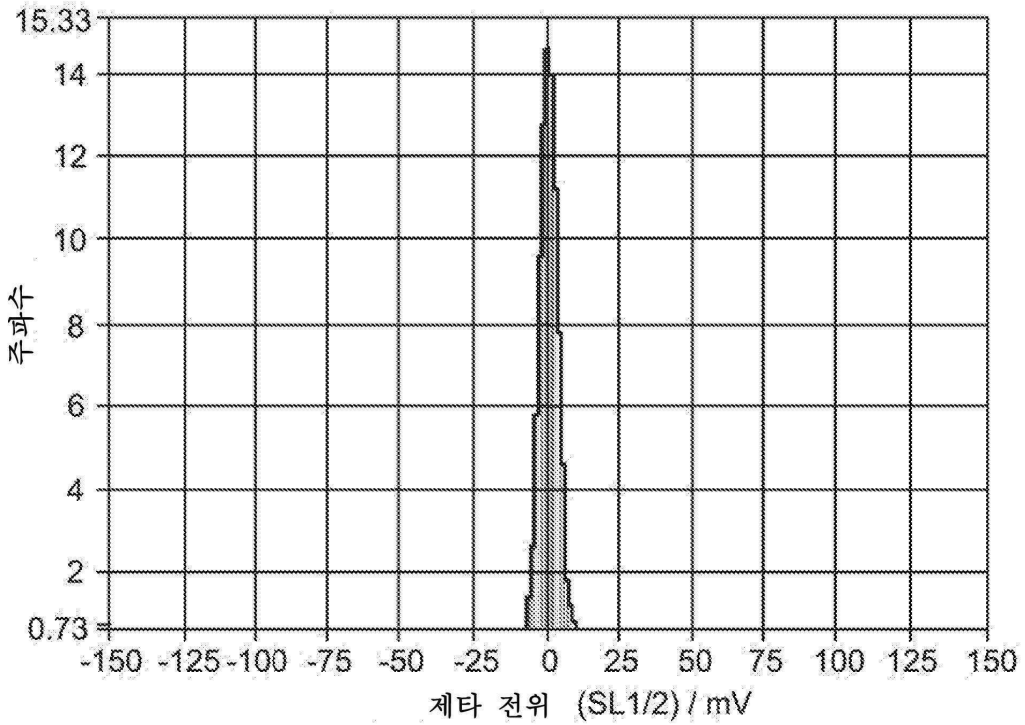
피크 분석 (절대 수)

직경 /nm	절대수	FWHM/nm	백분율
117.1	24.1	72.3	100.0

X 값

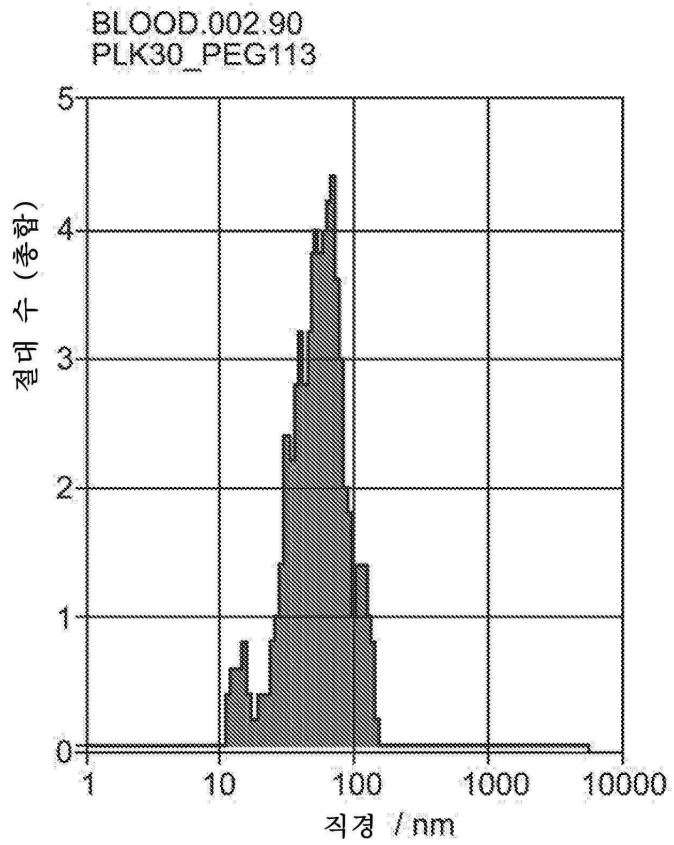
	수	농도	부피
X10	40.1	40.1	156.8
X50	108.4	108.4	705.8
X90	175.4	175.4	1086.1
너비	1.2	1.2	1.3
평균	126.0	126.0	710.0
표준편차	103.9	103.9	363.6

도면43b



이동도: -0.02 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.02 µm/sec/V/cm ZP 인자: 12.9 (스몰루호프스키) 제타 전위 @ 25°C: -0.25 ± 0.12 mV 제타 전위 분포: -0.25 mV FWHM 7.51 (SL1/2)

도면44a



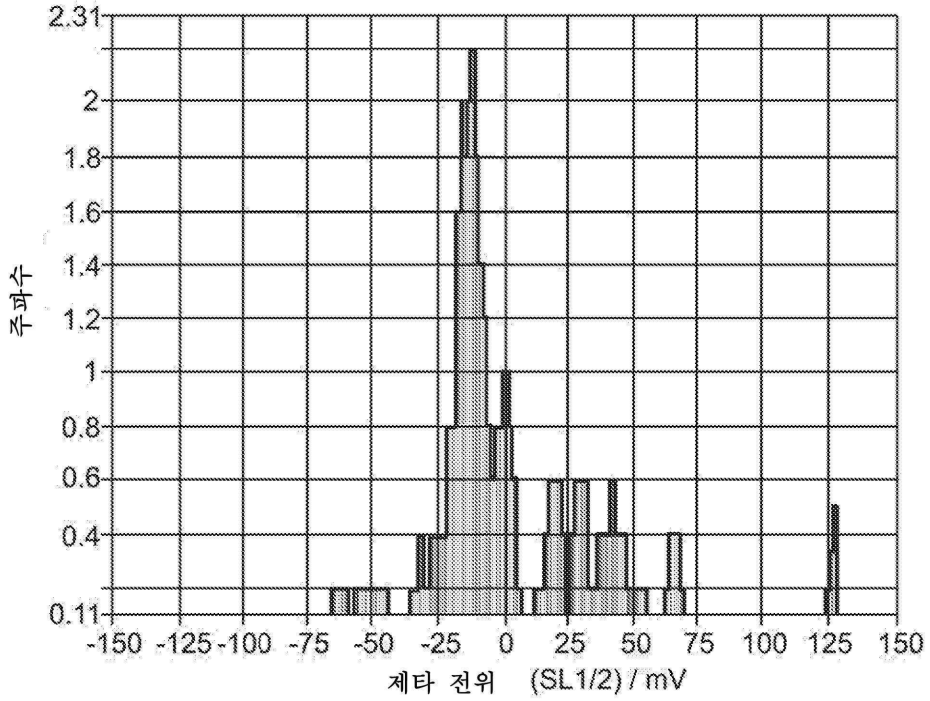
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
60.1	4.0	49.7	94.8
14.4	0.6	4.8	5.2

X 값

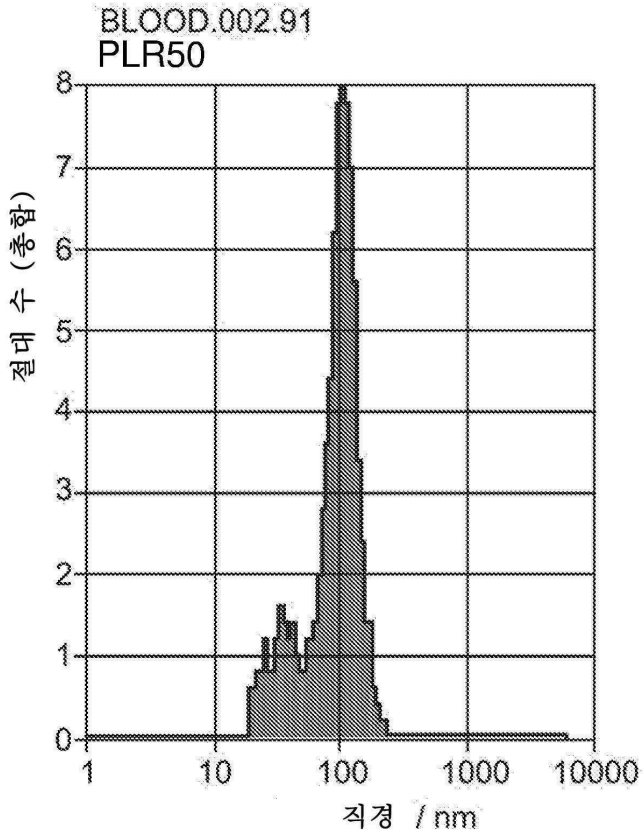
	수	농도	부피
X10	27.4	27.4	54.0
X50	53.4	53.4	89.3
X90	98.8	98.8	121.0
너비	1.3	1.3	0.8
평균	58.1	58.1	92.6
표준편차	27.3	27.3	29.1

도면44b



이동도:	0.20 ± 0.03 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.20 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 12.9 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: 2.54 ± 0.34 mV
제타 전위 분포:	2.54 mV FWHM 11.52 (SL1/2)

도면45a



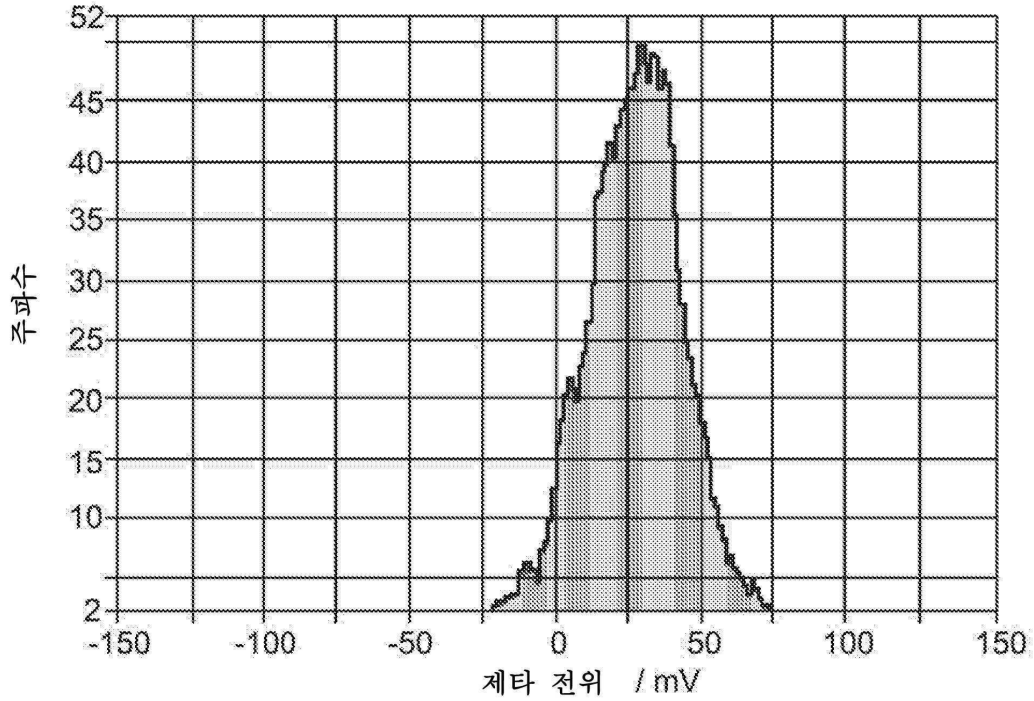
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
106.7	8.0	53.7	83.1
37.9	1.4	18.9	16.9

X 값

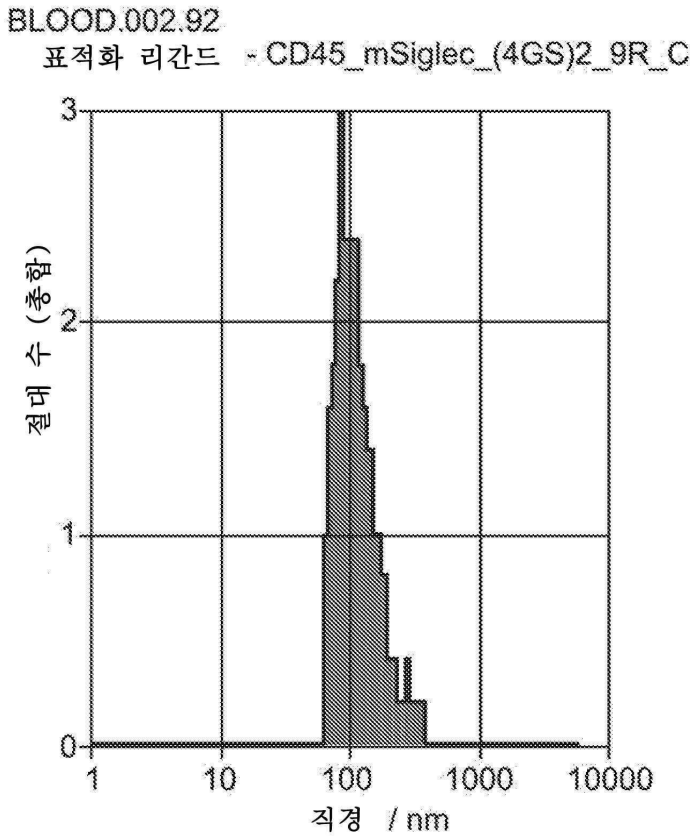
	수	농도	부피
X10	36.1	36.1	88.5
X50	98.5	98.5	115.5
X90	129.1	129.1	165.2
너비	0.9	0.9	0.7
평균	94.6	94.6	126.4
표준편차	36.7	36.7	31.6

도면45b



이동도: 2.09 FWHM 2.69 μm/sec/V/cm, @ 25°C: 2.12 μm/sec/V/cm
ZP 인자: 12.9 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: 27.10 FWHM 18.40 mV
농도: 3.6E+7 입자 / mL

도면46a



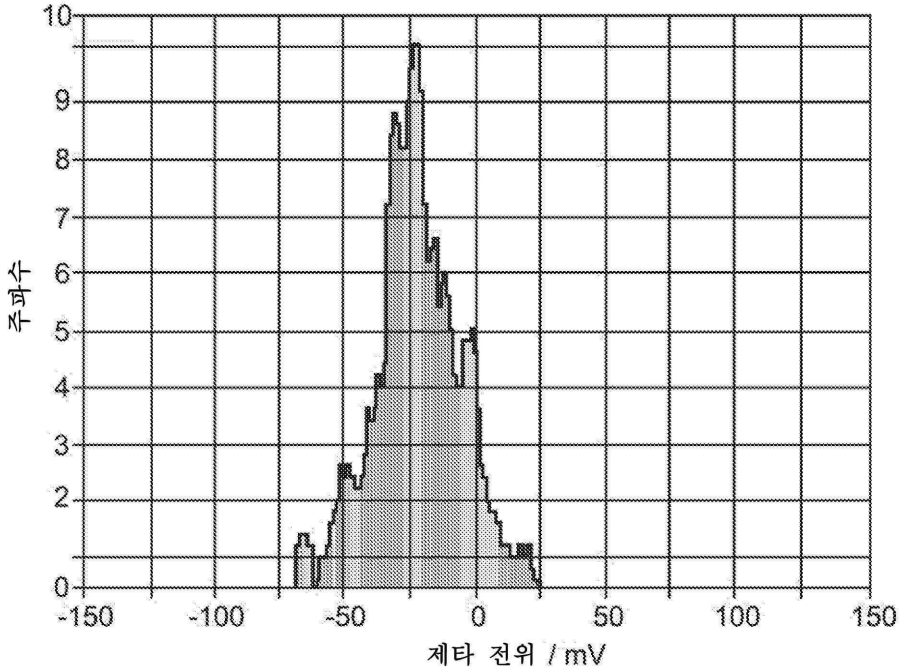
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
95.8	2.4	65.5	100.0

X 값

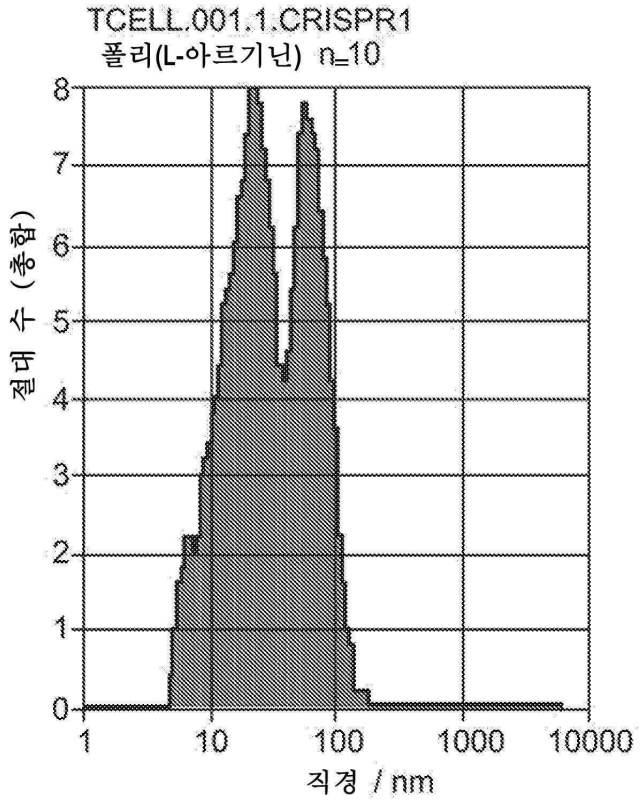
	수	농도	부피
X10	72.8	72.8	98.4
X50	100.3	100.3	194.2
X90	170.0	170.0	312.4
너비	1.0	1.0	1.1
평균	120.8	120.8	215.5
표준편차	54.0	54.0	86.4

도면46b



이동도: -1.73 FWHM 1.98 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1.73 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 12.8 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -22.16 FWHM 19.85 mV
농도: 5.2E+6 입자 / mL

도면47a



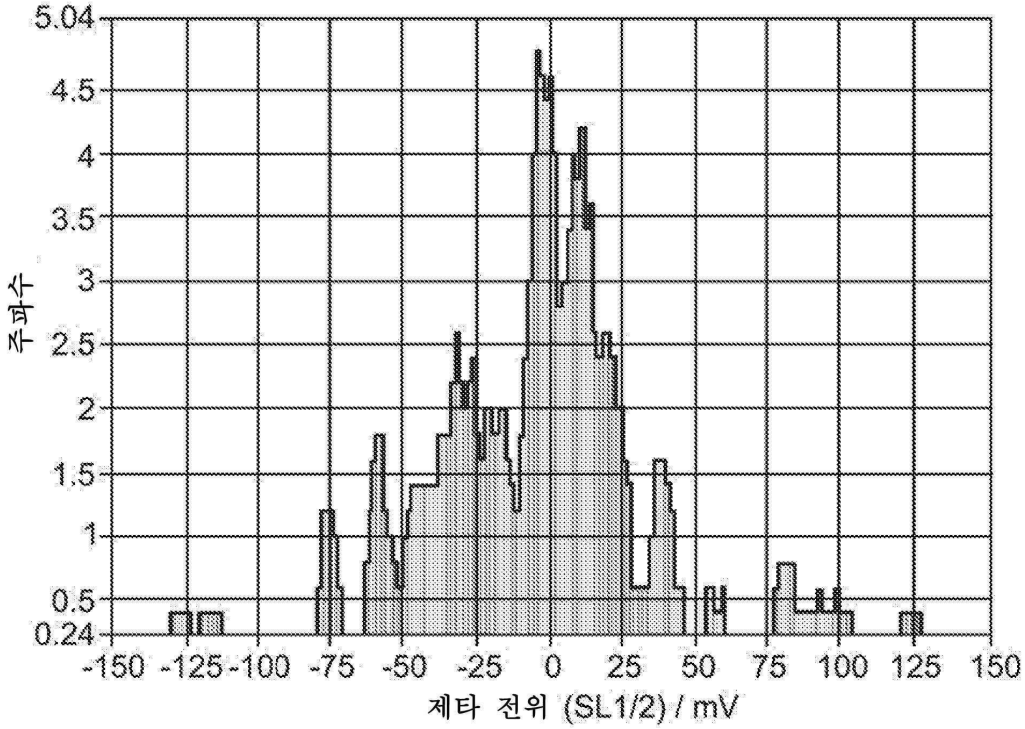
피크 분석 (절대 수)

직경 /nm	절대수	FWHM / nm	백분율
22.7	8.0	25.9	60.4
61.5	7.6	55.1	39.6

X 값

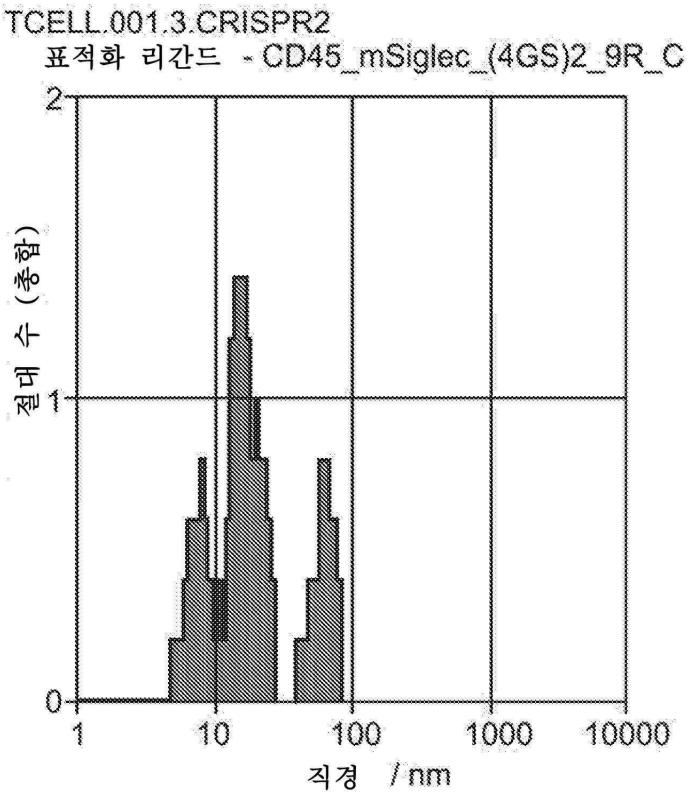
	수	농도	부피
X10	9.9	9.9	50.3
X50	27.4	27.4	81.1
X90	76.9	76.9	112.3
너비	2.4	2.4	0.8
평균	38.6	38.6	85.9
표준편차	27.6	27.6	29.9

도면47b



이동도:	-0.22 ± 0.02 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.25 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 14.8 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: -3.24 ± 0.32 mV
제타 전위 분포:	-3.24 mV FWHM 26.36 (SL1/2)
농도:	4.1E+7 입자 / mL

도면48a



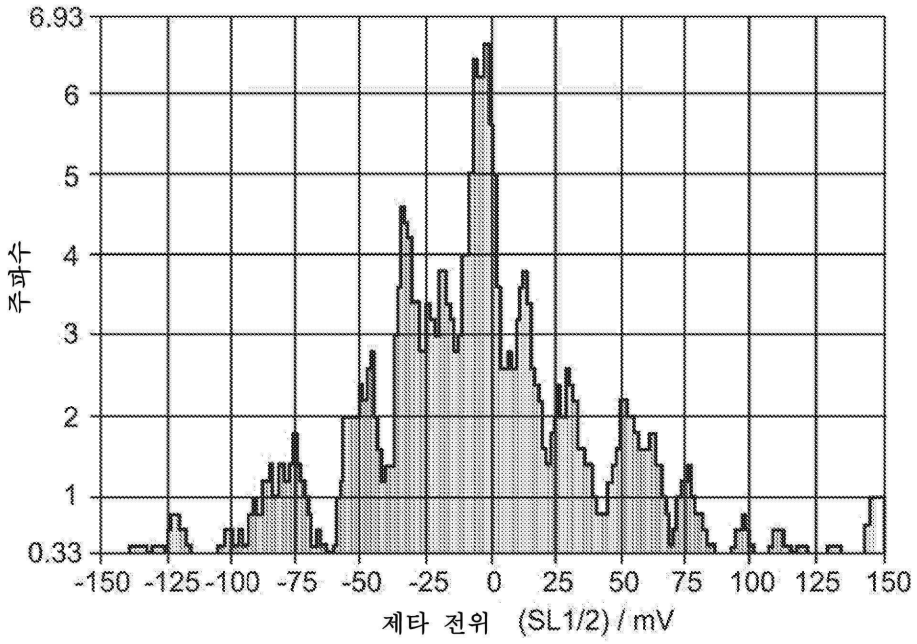
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
16.3	1.4	11.4	56.4
62.9	0.8	23.4	22.7
7.7	0.6	3.2	20.9

X 값

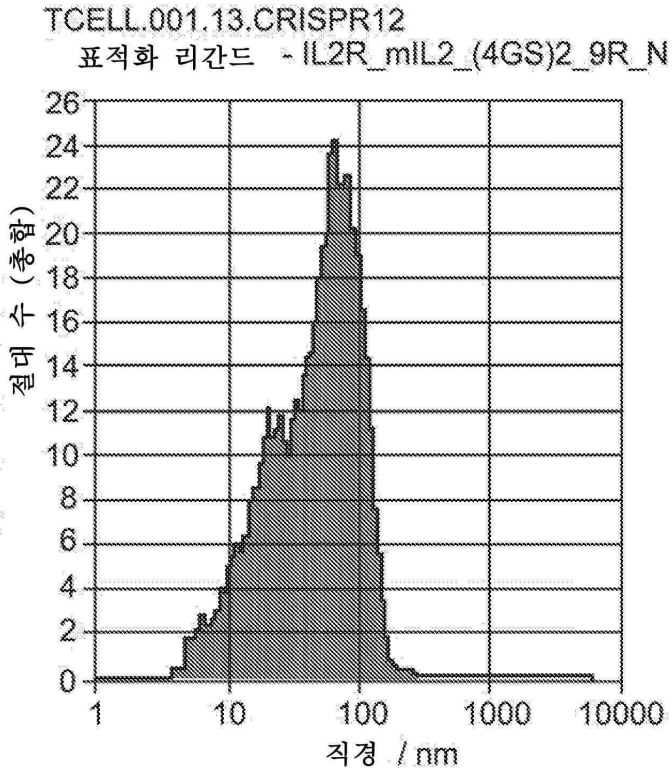
	수	농도	부피
X10	7.2	7.2	44.8
X50	15.3	15.3	65.2
X90	64.2	64.2	68.8
너비	3.7	3.7	0.4
평균	25.2	25.2	62.3
표준편차	21.2	21.2	NaN

도면48b



이동도: -0.07 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.08 µm/sec/V/cm
ZP 인자: **14.7** (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -0.98 ± 0.08 mV
제타 전위 분포: -.98 mV FWHM 11.33 (SL1/2)
농도: 7.2E+7 입자 / mL

도면49a



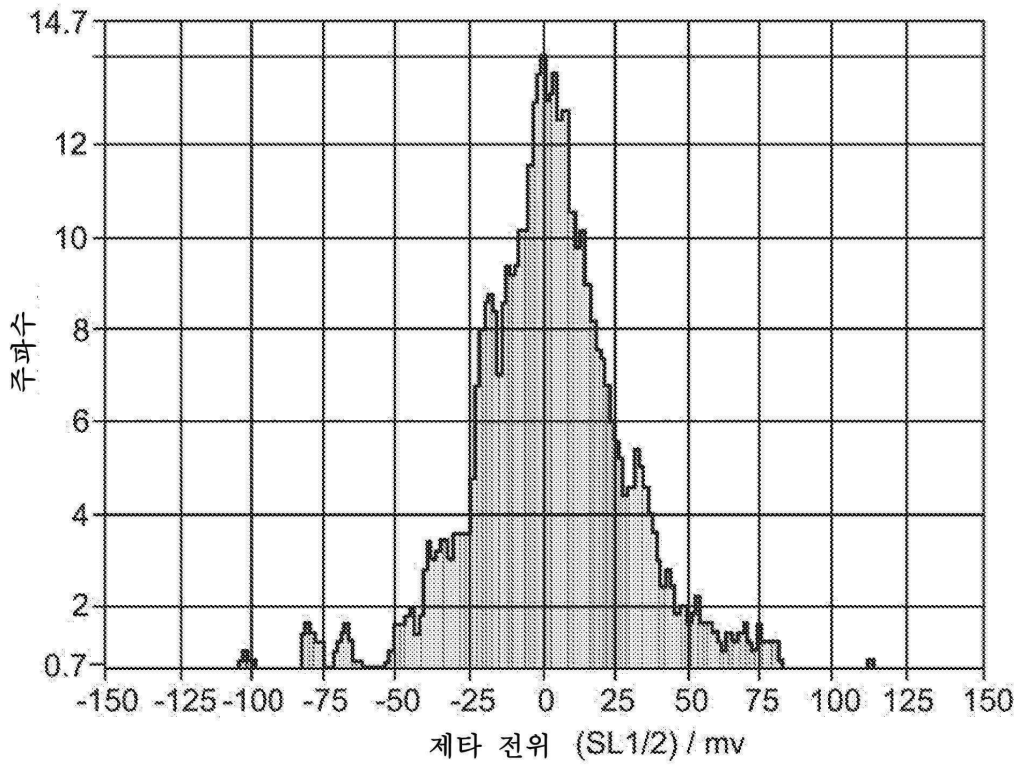
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
69.6	22.2	83.8	100.0

X 값

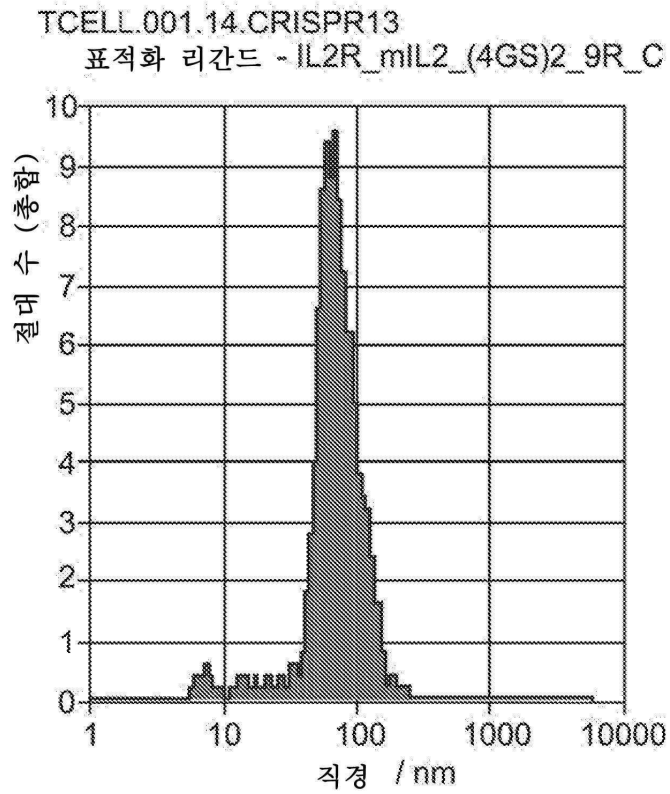
	수	농도	부피
X10	13.0	13.0	62.5
X50	49.7	49.7	102.0
X90	100.7	100.7	156.9
너비	1.8	1.8	0.9
평균	55.1	55.1	112.2
표준편차	35.6	35.6	43.8

도면49b



이동도:	0.15 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.17 µm/sec/V/cm	
ZP 인자: 14.8 (스몰루호프스키)		
제타 전위	@ 25°C: 2.19 ± 0.08 mV	
제타 전위 분포:		2.19 mV FWHM 42.28 (SL1/2)
농도:	6.5E+7	입자 / mL

도면50a



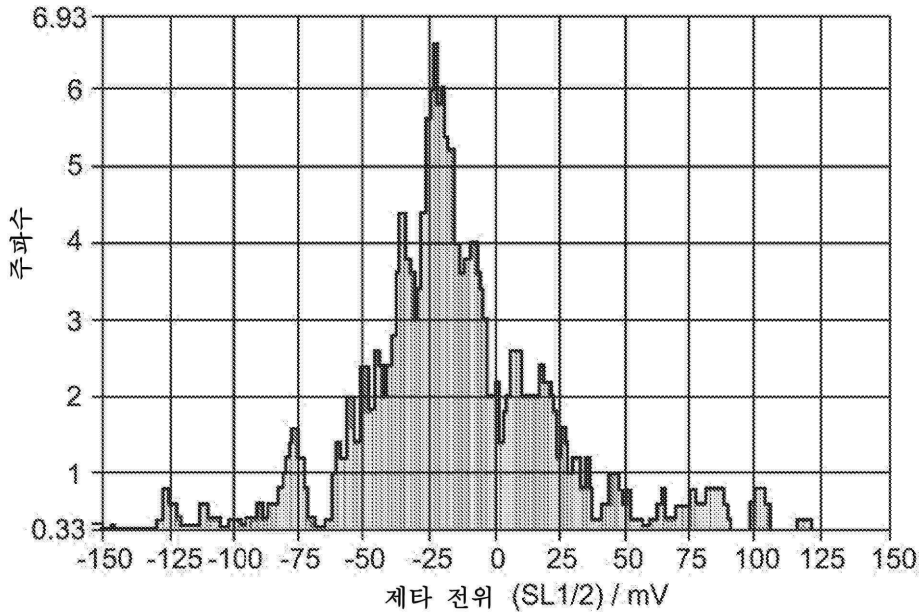
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm
67.6	9.2	49.2

X 값

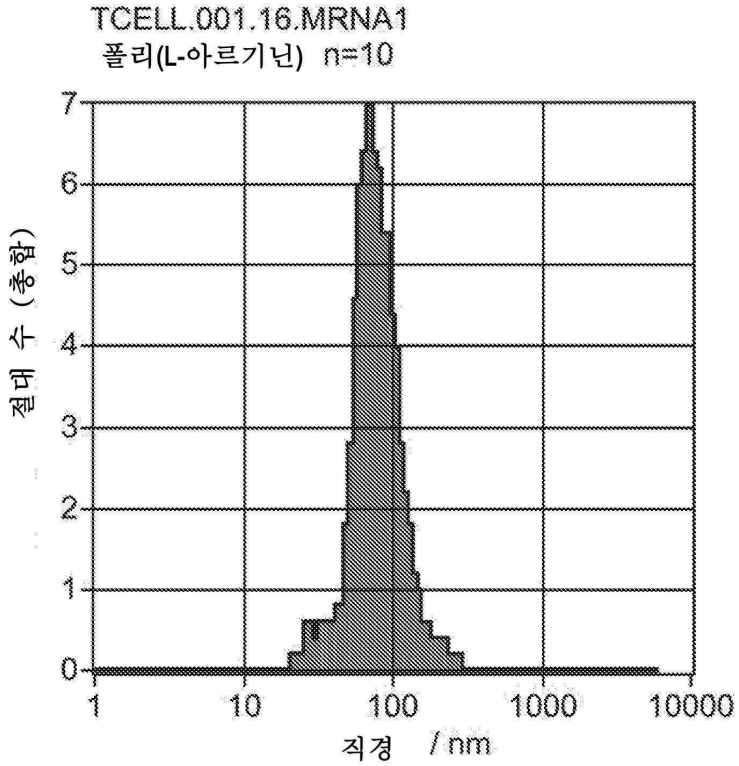
	수	농도	부피
X10	45.0	45.0	62.8
X50	65.9	65.9	106.8
X90	110.6	110.6	199.2
너비	1.0	1.0	1.3
평균	74.4	74.4	118.3
표준편차	32.0	32.0	46.5

도면50b



이동도: -0.63 ± 0.01 um/sec/V/cm. @ 25°C: -0.73 μm/sec/V/cm
ZP 인자: **14.9** (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -9.37 ± 0.16 mV
제타 전위 분포: -9.37 mV FWHM 27.63 (SL1/2)
농도: 3.5E+7 입자 / mL

도면51a



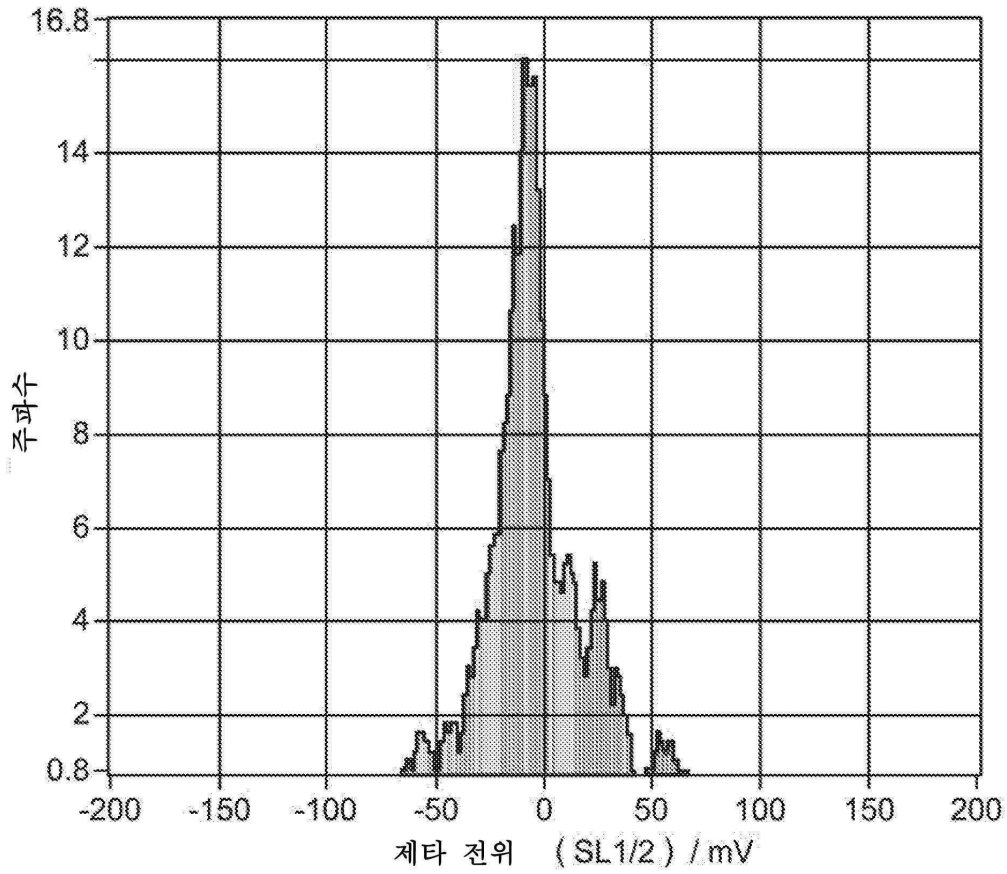
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
74.0	6.5	54.3	100.0

X 값

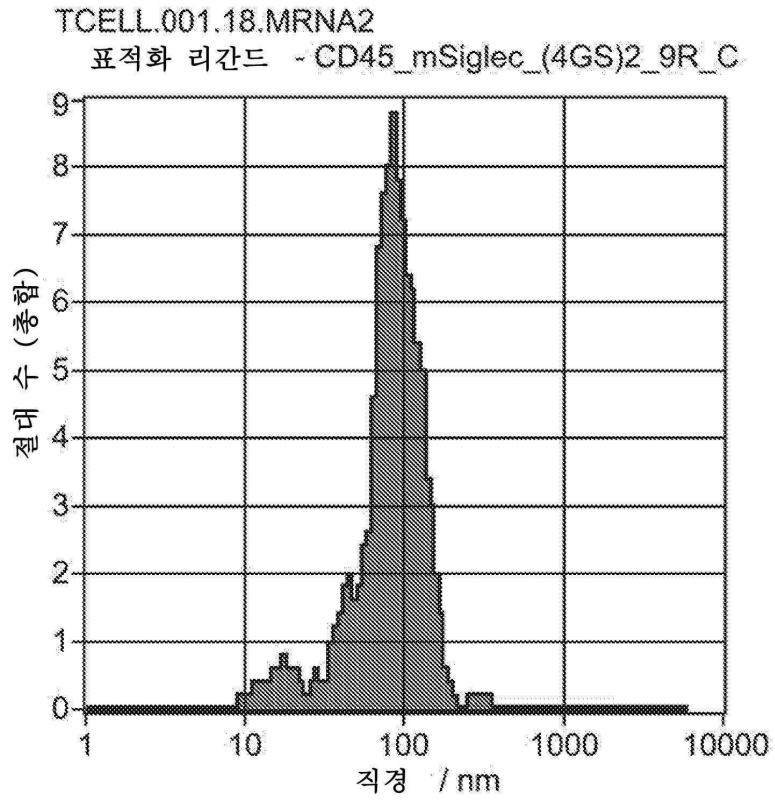
	수	농도	부피
X10	52.5	52.5	68.4
X50	73.9	73.9	120.7
X90	117.5	117.5	233.2
너비	0.9	0.9	1.4
평균	83.0	83.0	142.0
표준편차	34.8	34.8	62.2

도면51b



이동도: -0.13 ± 0.02 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.15 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 15.3 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -1.96 ± 0.30 mV
제타 전위 분포: -1.96 mV FWHM 21.84 (SL1/2)
농도: 3.5E+7 입자 / mL

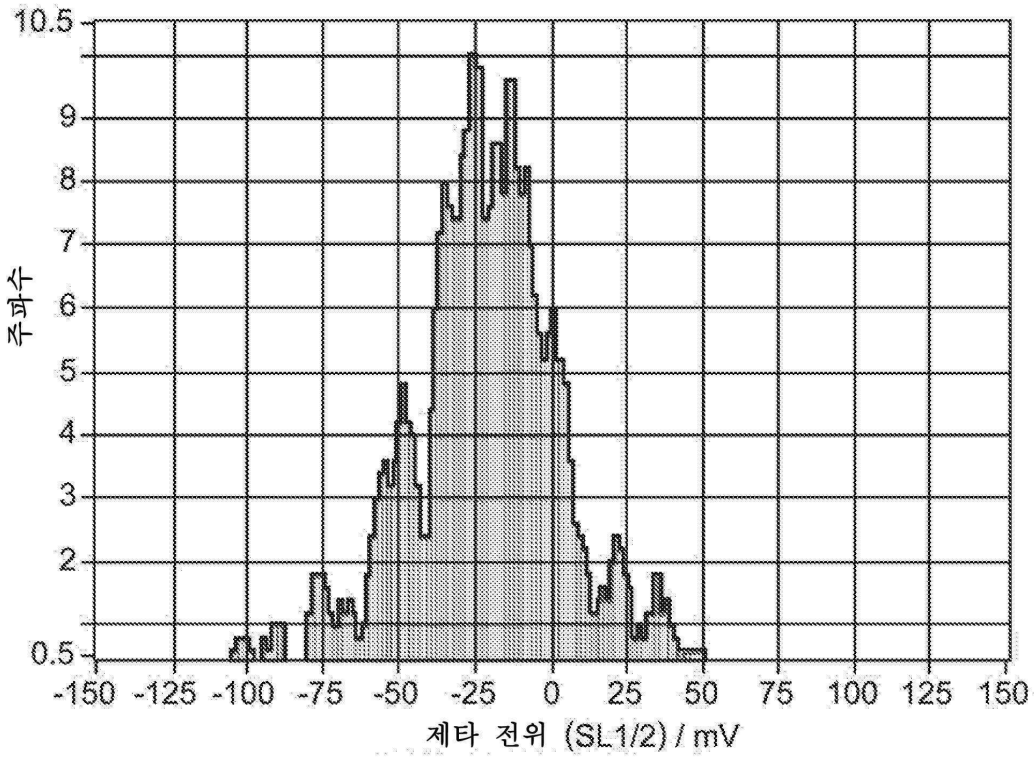
도면52a



피크 분석 (절대 수)

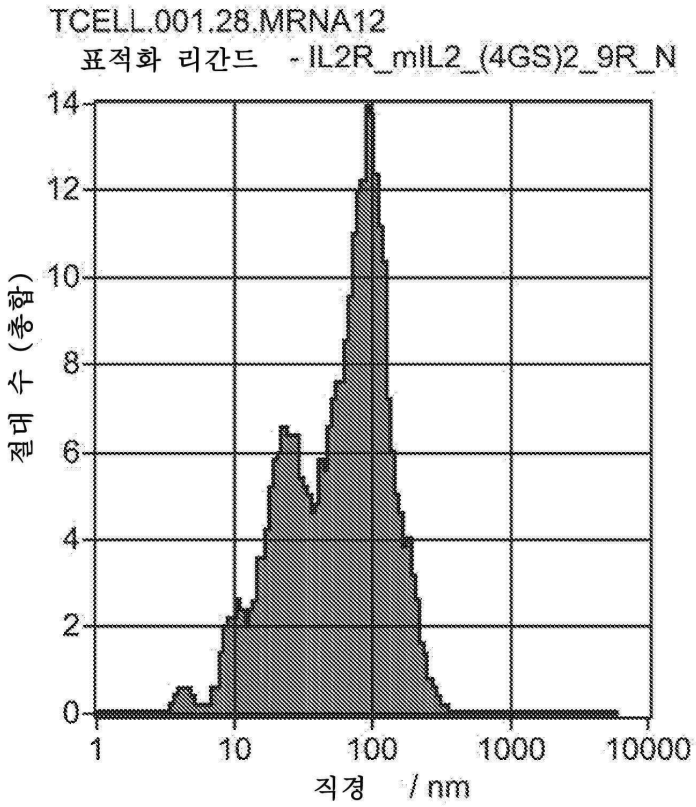
직경 / nm		절대수	FWHM / nm	백분율
	88.0	8.4	68.7	100.0
X 값		수	농도	부피
	X10	39.2	39.2	78.6
	X50	80.9	80.9	127.5
	X90	129.8	129.8	287.4
	너비	1.1	1.1	1.6
	평균	88.6	88.6	156.1
표준편차		40.6	40.6	76.4

도면52b



이동도: -1.36 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1.58 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 14.9 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -20.26 ± 0.15 mV
제타 전위 분포: -20.26 mV FWHM 20.45 (SL1/2)
농도: 2.0E+7 입자 / mL

도면53a



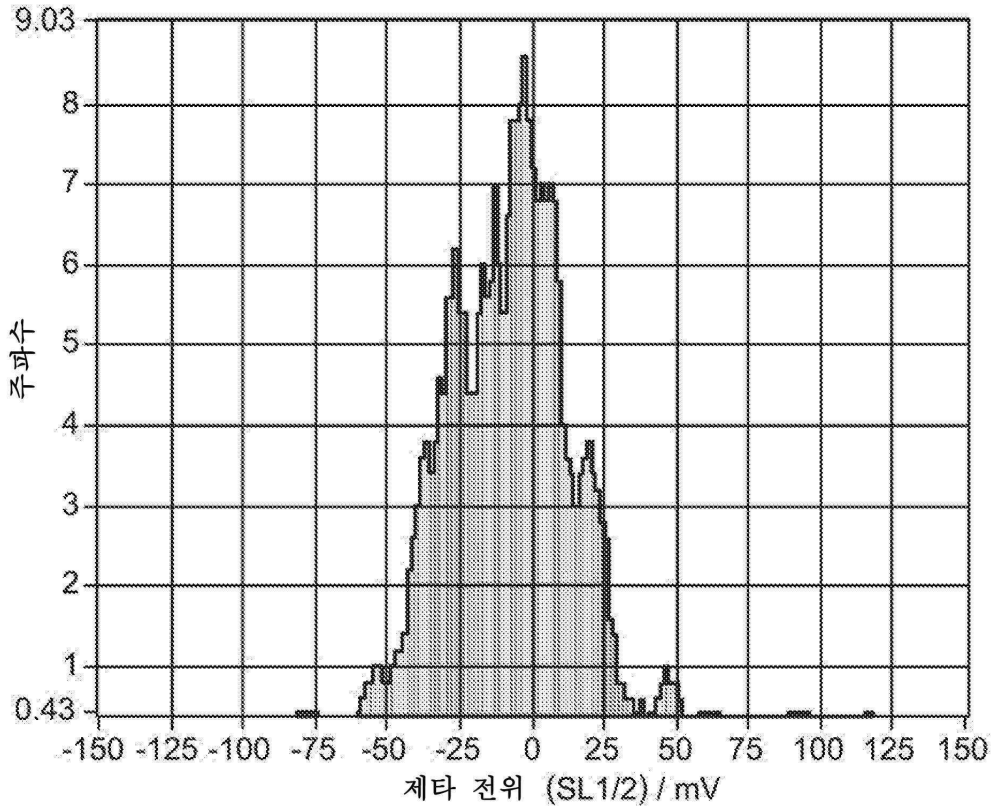
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
92.3	14.0	79.7	70.3
24.9	6.4	17.7	29.7

X 값

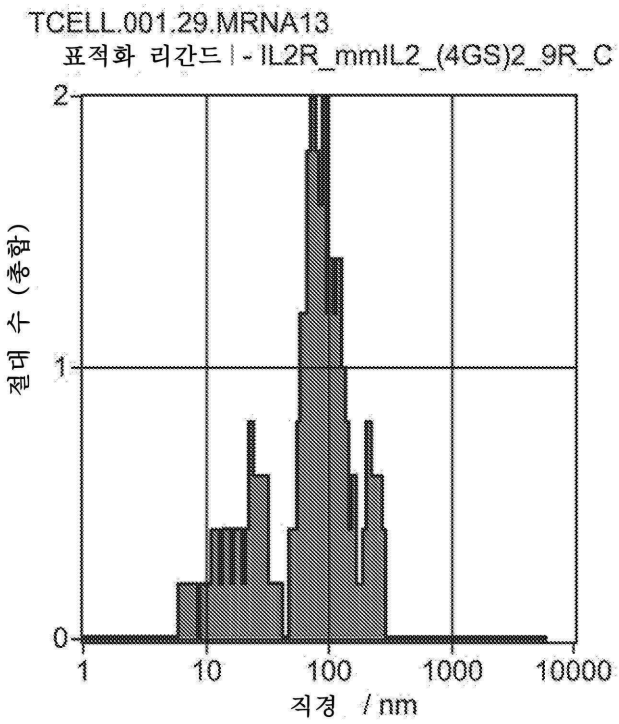
	수	농도	부피
X10	16.4	16.4	86.1
X50	63.9	63.9	160.6
X90	133.4	133.4	251.4
너비	1.8	1.8	1.0
평균	73.1	73.1	168.2
표준편차	51.9	51.9	64.7

도면53b



이동도: -0.29 ± 0.02 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.34 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 14.8 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -4.30 ± 0.23 mV
제타 전위 분포: : -4.30 mV FWHM 35.23 (SL1/2)
농도: 4.6E+7 입자 / mL

도면54a

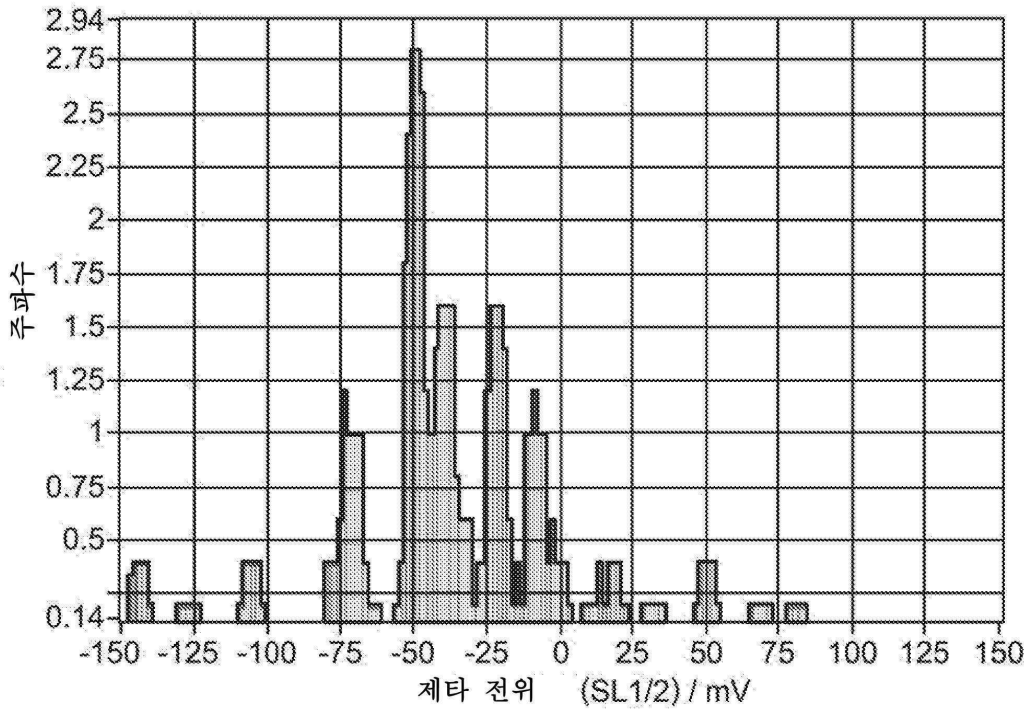


피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
81.6	1.7	71.1	62.9
218.1	0.7	81.1	11.2
25.6	0.6	9.0	17.1
14.7	0.4	2.5	8.8

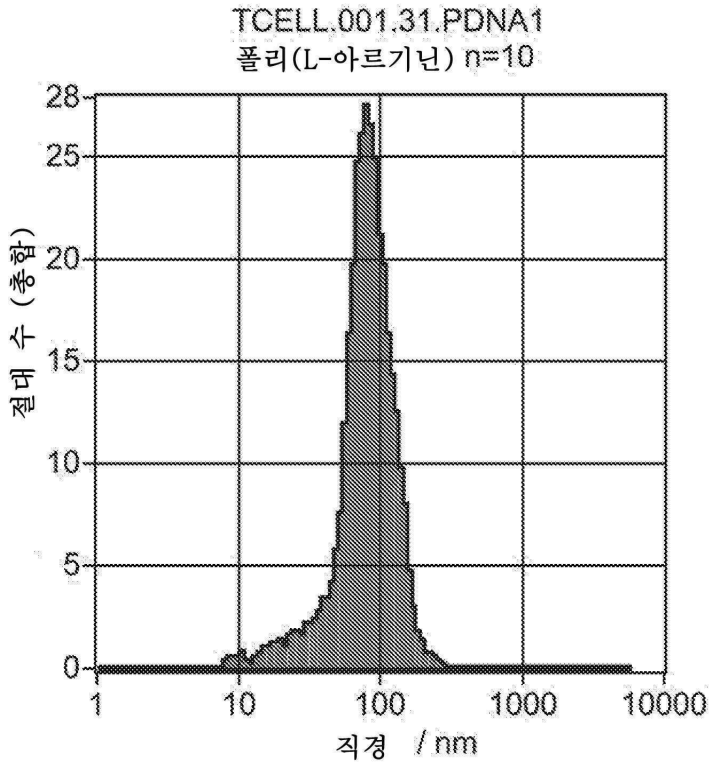
X 값	수	농도	부피
X10	15.7	15.7	97.8
X50	76.9	76.9	219.9
X90	178.5	178.5	238.0
너비	2.1	2.1	0.6
평균	87.6	87.6	194.2
표준편차	62.8	62.8	59.8

도면54b



이동도: -2.47 ± 0.04 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -2.86 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 14.8 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -36.64 ± 0.64 mV
제타 전위 분포: -36.64 mV FWHM 8.84 (SL1/2)

도면55a

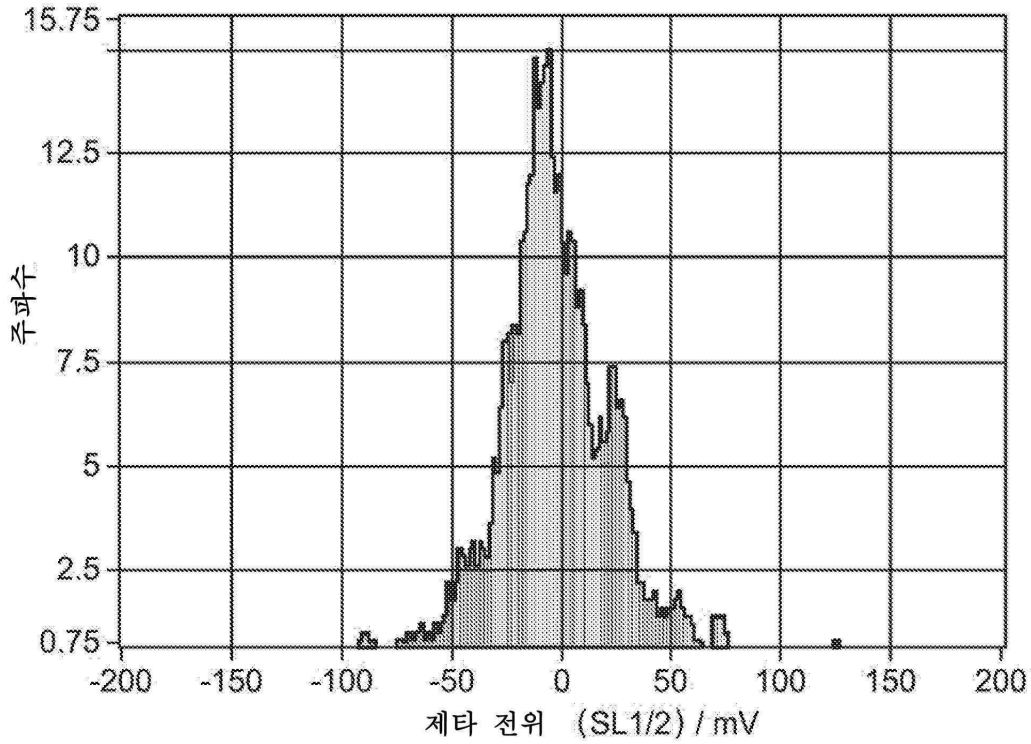


피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
82.0	27.3	65.7	100.0

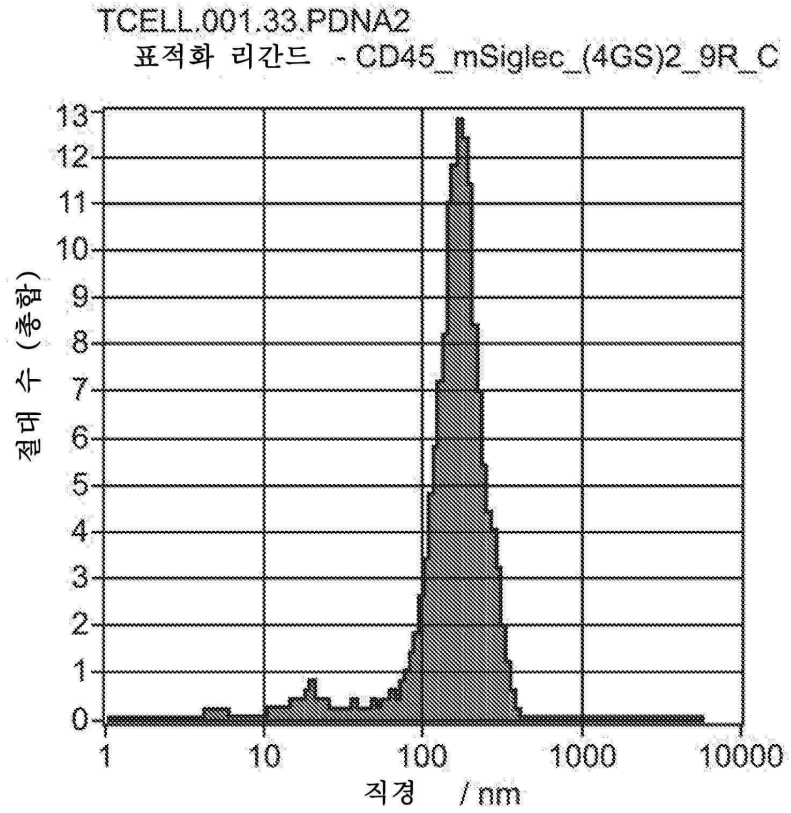
X 값	수	농도	부피
X10	42.8	42.8	74.8
X50	78.5	78.5	118.4
X90	126.2	126.2	198.6
너비	1.1	1.1	1.0
평균	85.5	85.5	128.7
표준편차	35.0	35.0	46.3

도면55b



이동도:	-0.21 ± 0.05 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.25 µm/sec/V/cm	
ZP 인자: 15.5 (스몰루호프스키)		
제타 전위	@ 25°C: -3.22 ± 0.73 mV	
제타 전위 분포:	-3.22 mV FWHM 40.03 (SL1/2)	
농도:	4.0E+7	입자 / mL

도면56a



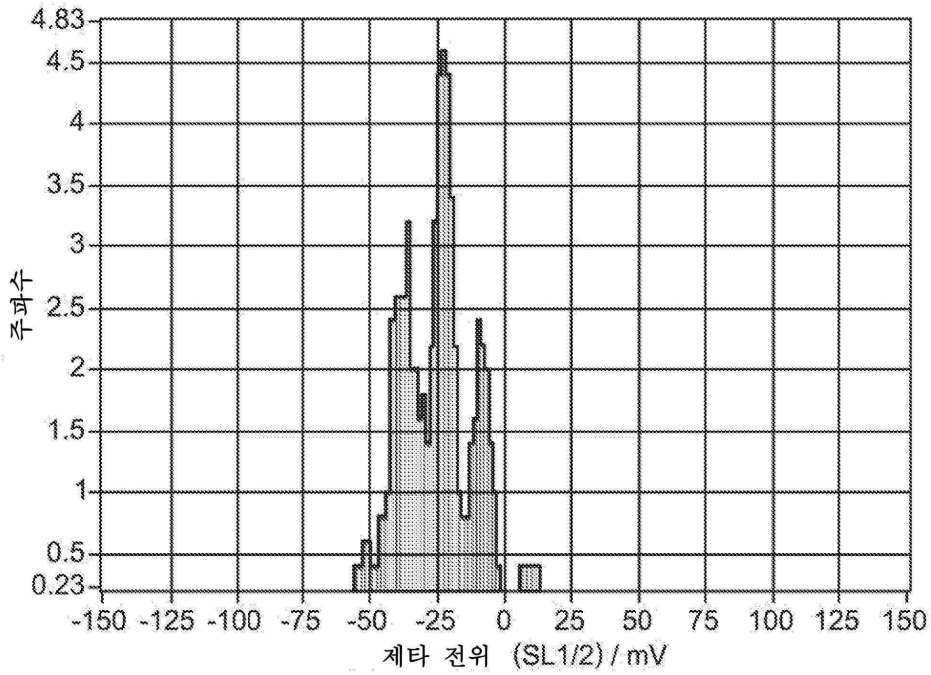
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
171.2	12.8	106.8	100.0

X 값

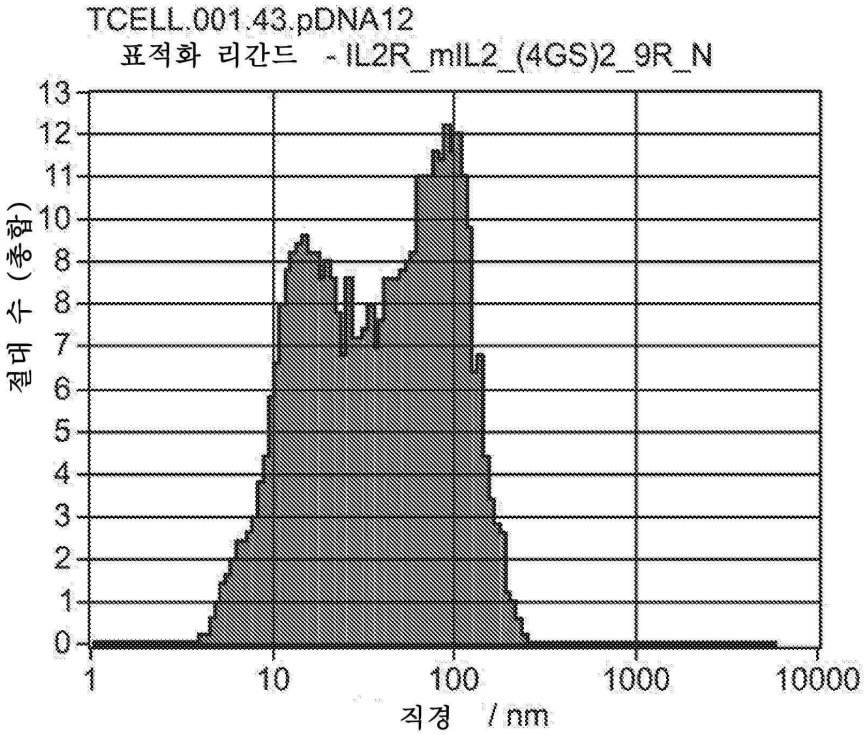
	수	농도	부피
X10	89.8	89.8	149.0
X50	163.5	163.5	212.2
X90	246.7	246.7	299.9
너비	1.0	1.0	0.7
평균	167.6	167.6	227.0
표준편차	64.5	64.5	59.5

도면56b



이동도:	-1.73 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1.99 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 14.7 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: -25.51 ± 0.16 mV
제타 전위 분포:	-25.51 mV FWHM 8.59 (SL1/2)
농도:	9.0E+6 입자 / mL

도면57



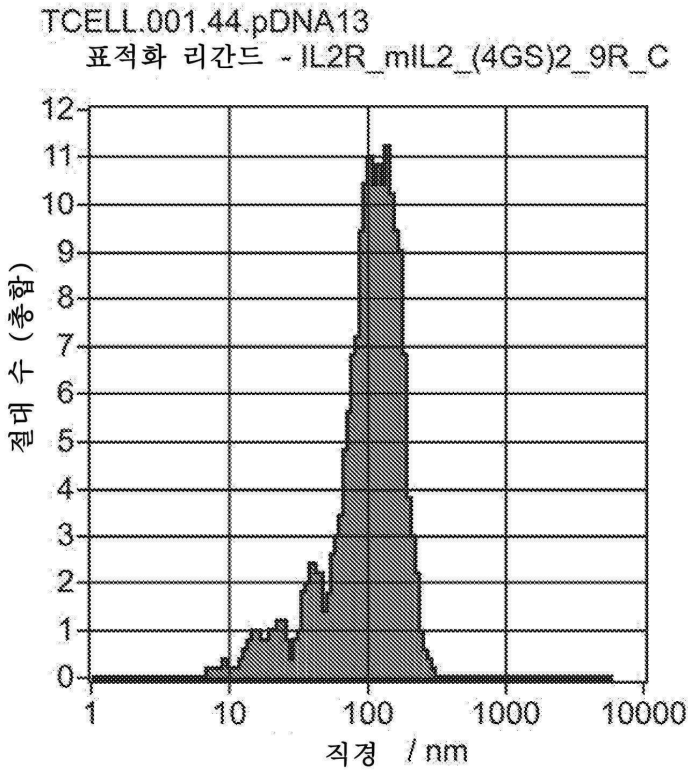
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
88.5	11.8	109.4	57.6
15.9	9.4	20.8	42.4

X 값

	수	농도	부피
X10	11.0	11.0	73.3
X50	40.4	40.4	121.0
X90	113.7	113.7	186.2
너비	2.5	2.5	0.9
평균	54.4	54.4	130.3
표준편차	43.2	43.2	42.5

도면58a

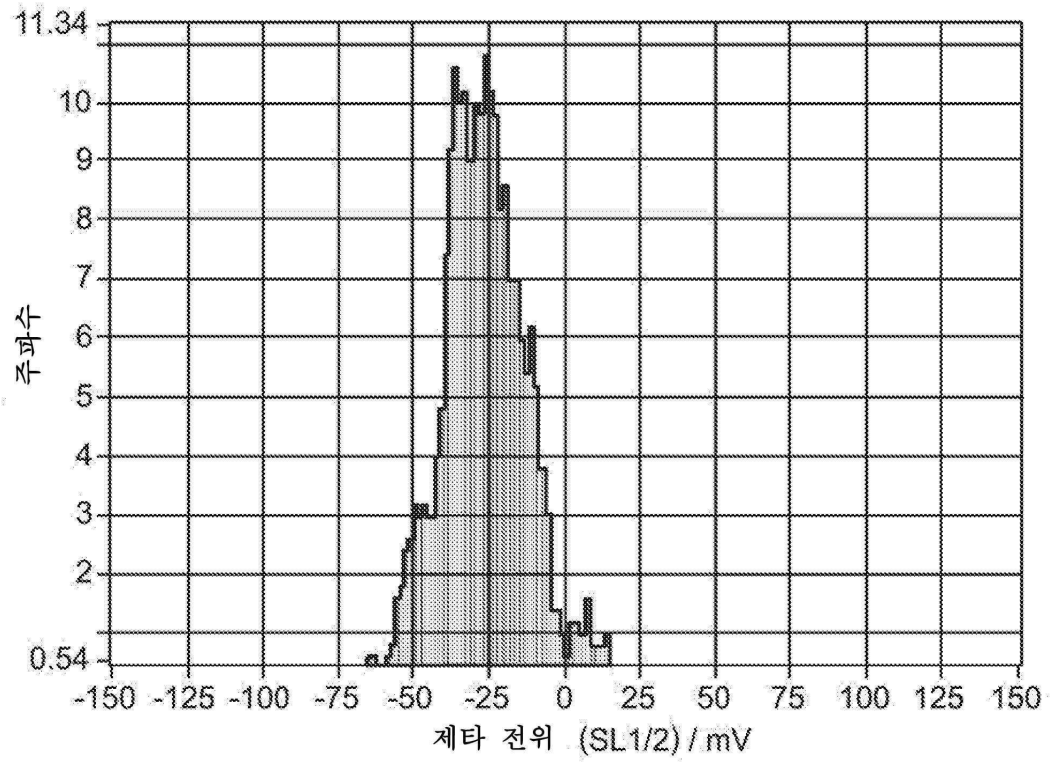


피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
122.3	10.7	113.9	93.2
20.1	1.0	13.2	6.8

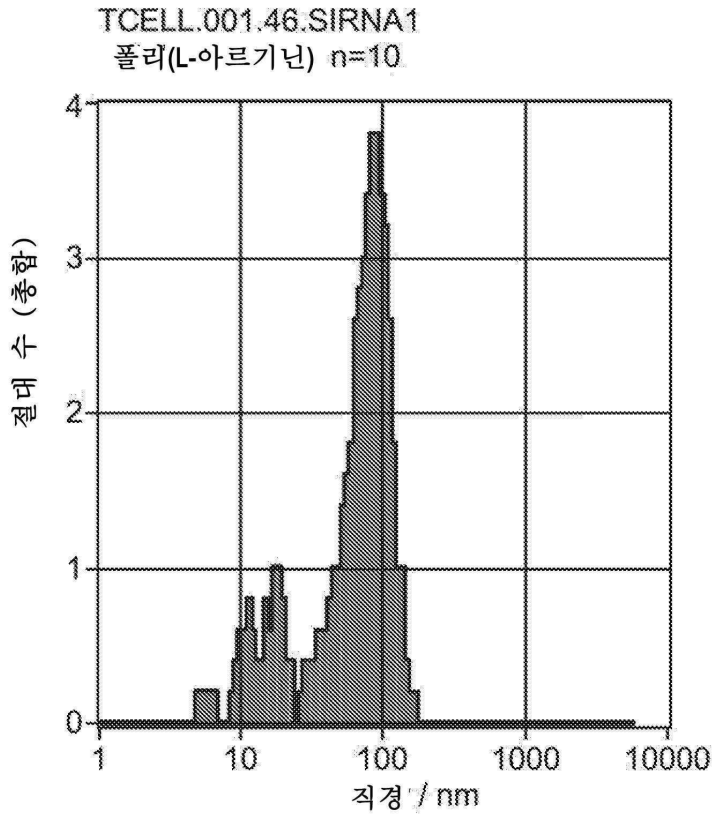
X 값	수	농도	부피
X10	37.6	37.6	102.4
X50	104.6	104.6	154.1
X90	166.1	166.1	215.1
너비	1.2	1.2	0.7
평균	109.6	109.6	162.5
표준편차	50.6	50.6	44.1

도면58b



이동도: -1.76 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -2.02 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 14.8 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -25.91 ± 0.14 mV
제타 전위 분포: -25.91 mV FWHM 31.89 (SL1/2)
농도: 4.3E+7 입자 / mL
희석 인자: 1
원래 농도: 4.3E+7 입자 / cm^3

도면59a



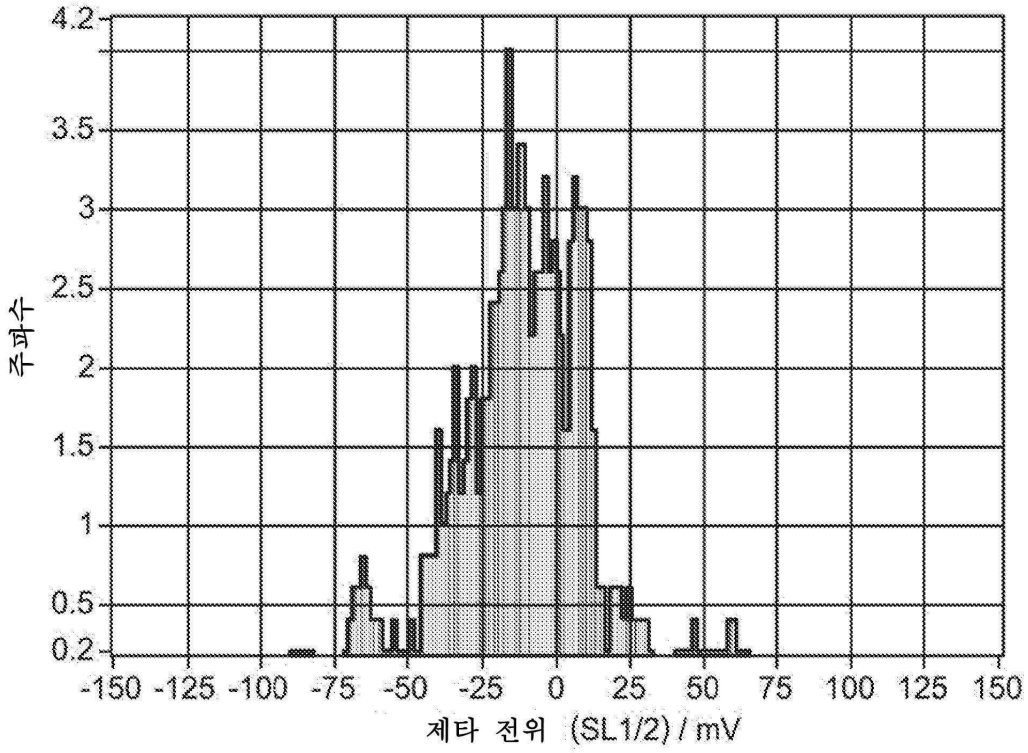
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
87.1	3.8	58.9	81.5
17.2	0.9	6.7	18.5

X 값

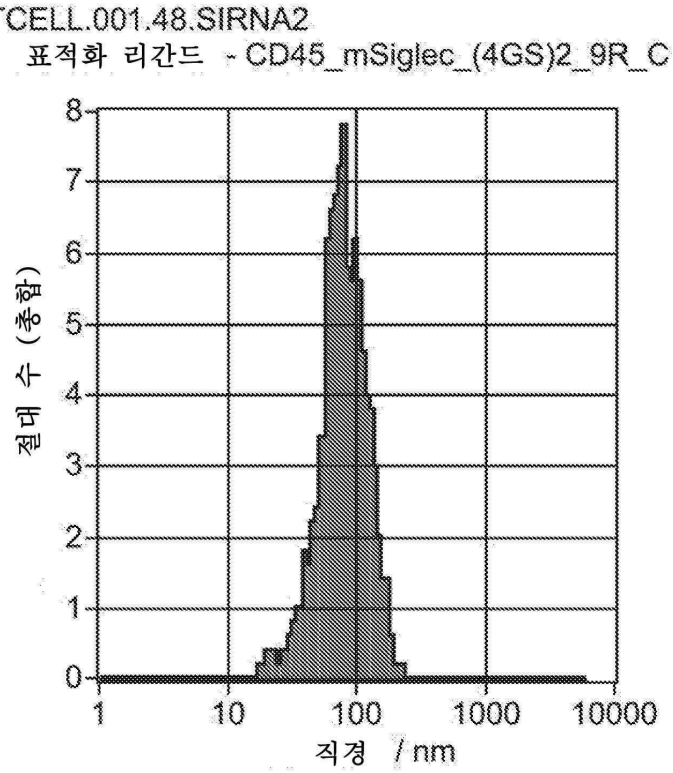
	수	농도	부피
X10	15.7	15.7	70.9
X50	71.7	71.7	99.4
X90	105.0	105.0	139.5
너비	1.2	1.2	0.7
평균	69.5	69.5	103.9
표준편차	35.8	35.8	25.2

도면59b



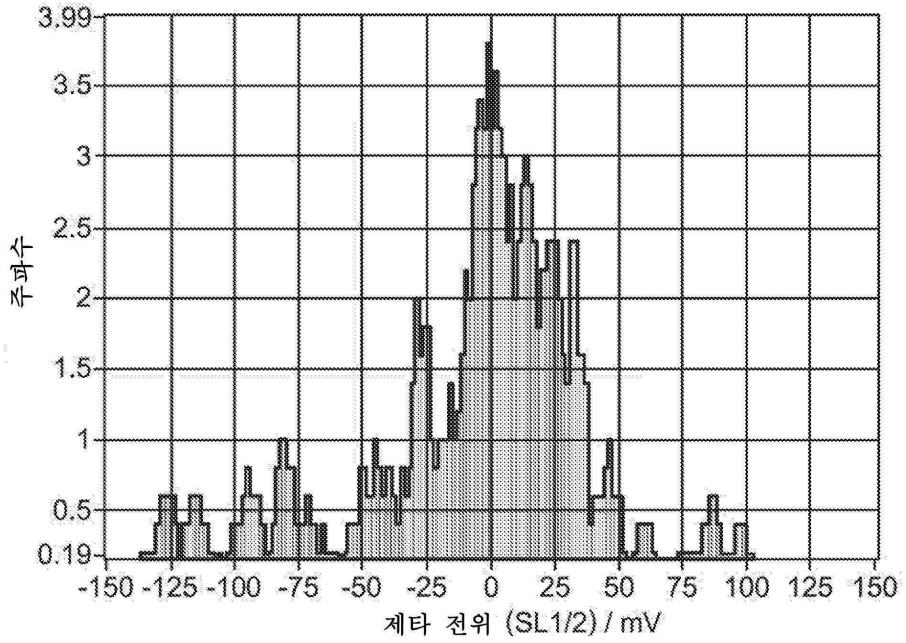
이동도:	-0.75 ± 0.13 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.87 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 15.0 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: -11.17 ± 1.97 mV
제타 전위 분포:	-11.17 mV FWHM 25.31 (SL1/2)
농도:	6.7E+6 입자 / mL

도면60a



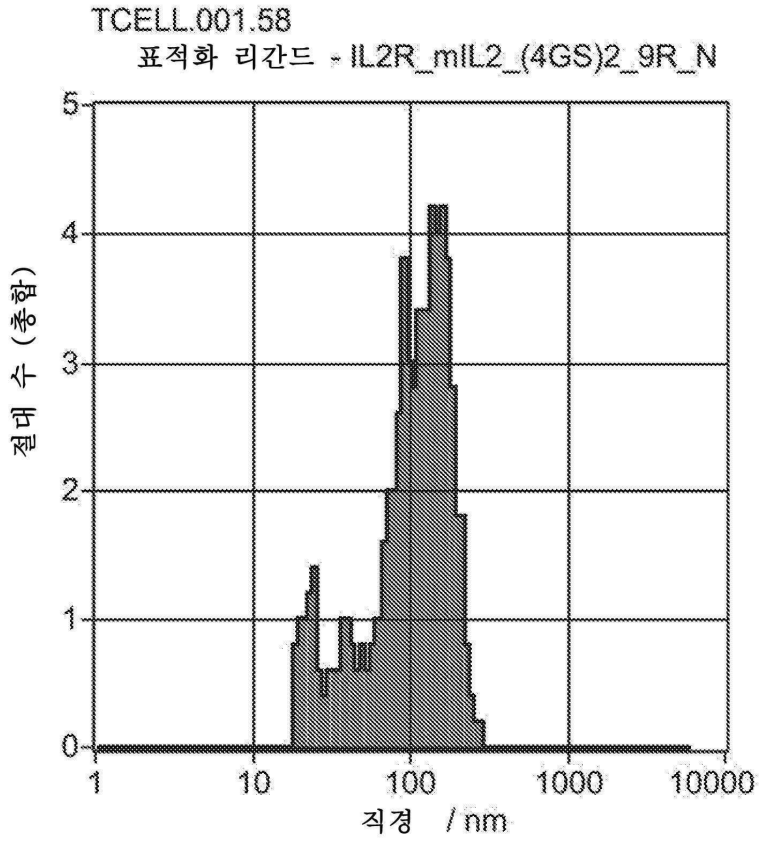
피크 분석 (절대 수)			
직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
78.8	7.7	68.1	100.0
X 값			
	수	농도	부피
X10	44.2	44.2	69.5
X50	74.7	74.7	115.0
X90	124.1	124.1	157.9
너비	1.1	1.1	0.8
평균	84.4	84.4	121.6
표준편차	33.1	33.1	37.1

도면60b



이동도: -1.04 ± 0.00 um/sec/V/cm. @ 25°C: -1.19 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 14.7 (스몰루호프스키)
제타 전위 @ 25°C: -15.25 ± 0.06 mV
제타 전위 분포: -15.25 mV FWHM 32.55 (SL1/2)
농도: 3.8E+7 입자 / mL

도면61a

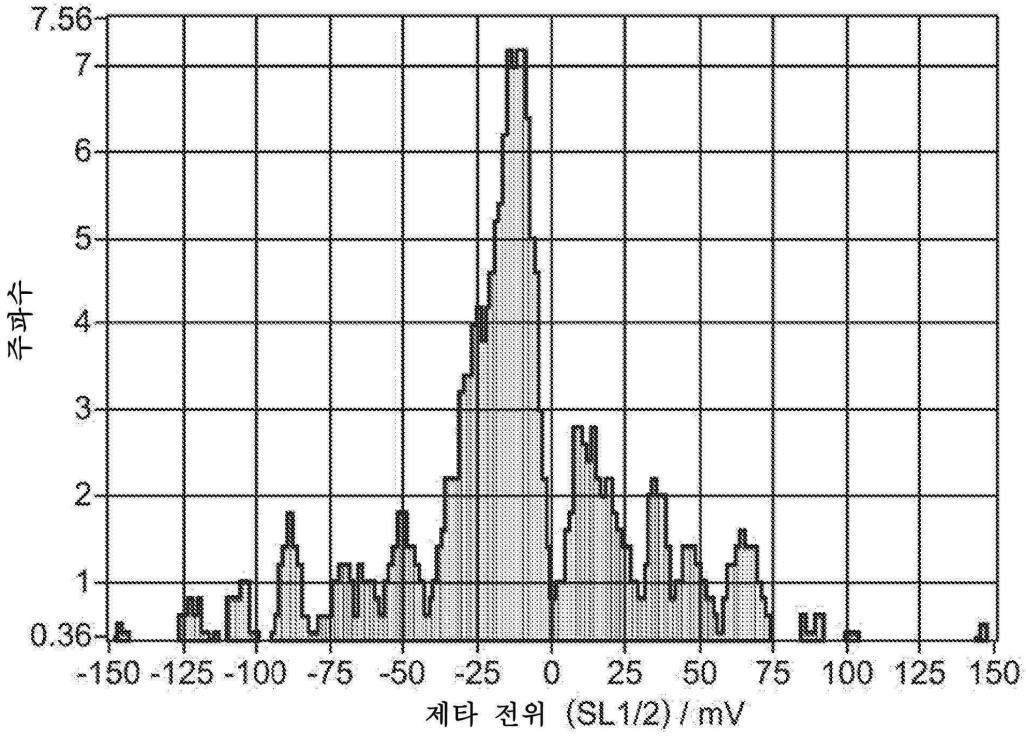


피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
139.8	4.2	111.6	90.6
23.6	1.3	7.7	9.4

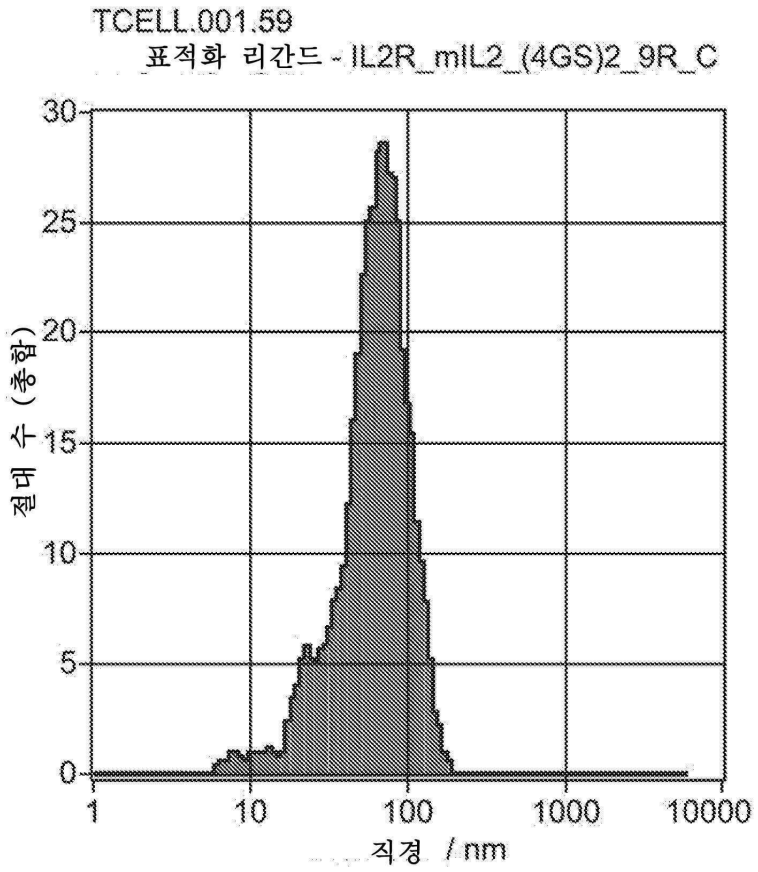
X 값	수	농도	부피
X10	28.0	28.0	103.5
X50	103.2	103.2	157.6
X90	176.5	176.5	208.2
너비	1.4	1.4	0.7
평균	110.4	110.4	165.5
표준편차	54.1	54.1	40.8

도면61b



이동도:	-0.68 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.79 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 14.9 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: -10.09 ± 0.12 mV
제타 전위 분포:	-10.09 mV FWHM 21.02 (SL1/2)
농도:	1.6E+7 입자 / mL

도면62a

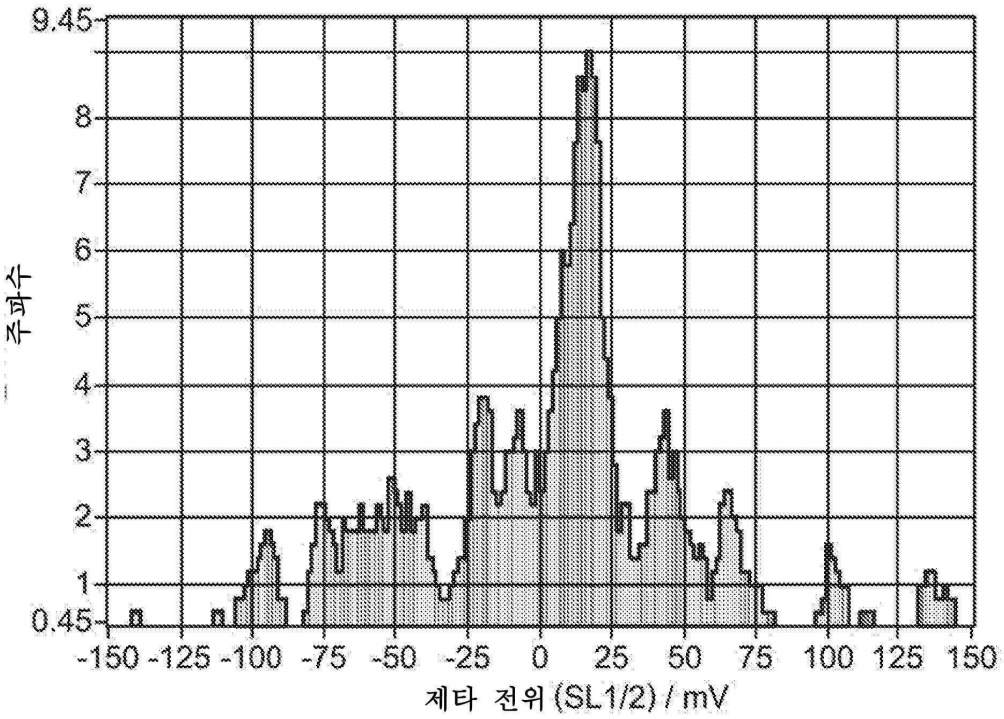


피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
68.7	28.5	62.9	100.0

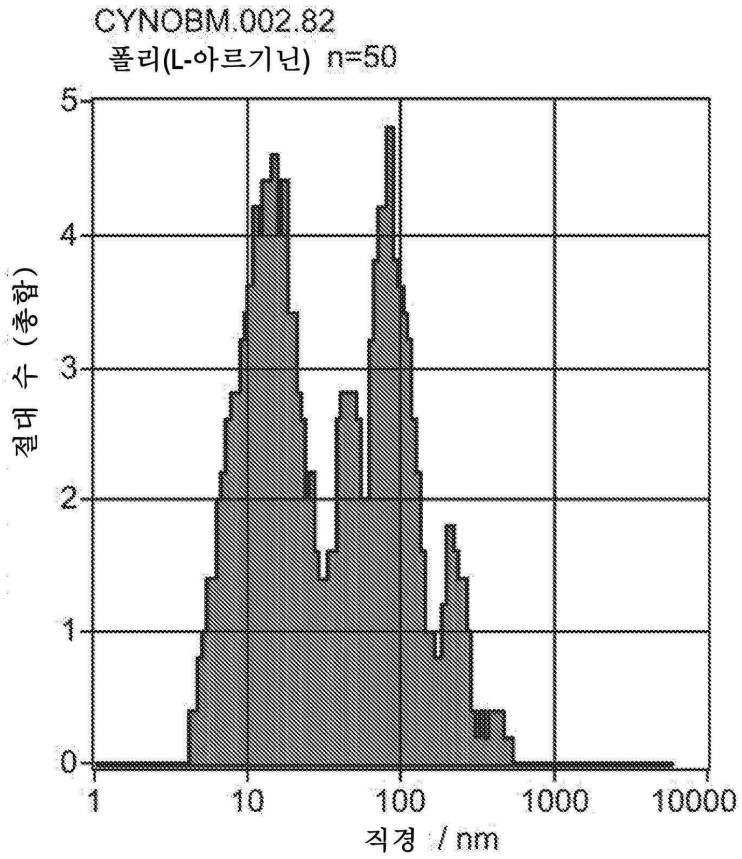
X 값	수	농도	부피
X10	26.3	26.3	60.5
X50	62.4	62.4	95.6
X90	104.5	104.5	137.9
너비	1.3	1.3	0.8
평균	66.6	66.6	100.8
표준편차	29.7	29.7	30.1

도면62b



이동도:	0.26 ± 0.23 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.31 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 14.9 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: 3.95 ± 3.43 mV
제타 전위 분포:	3.95 mV FWHM 16.95 (SL1/2)
농도:	4.2E+7 입자 / mL

도면63a

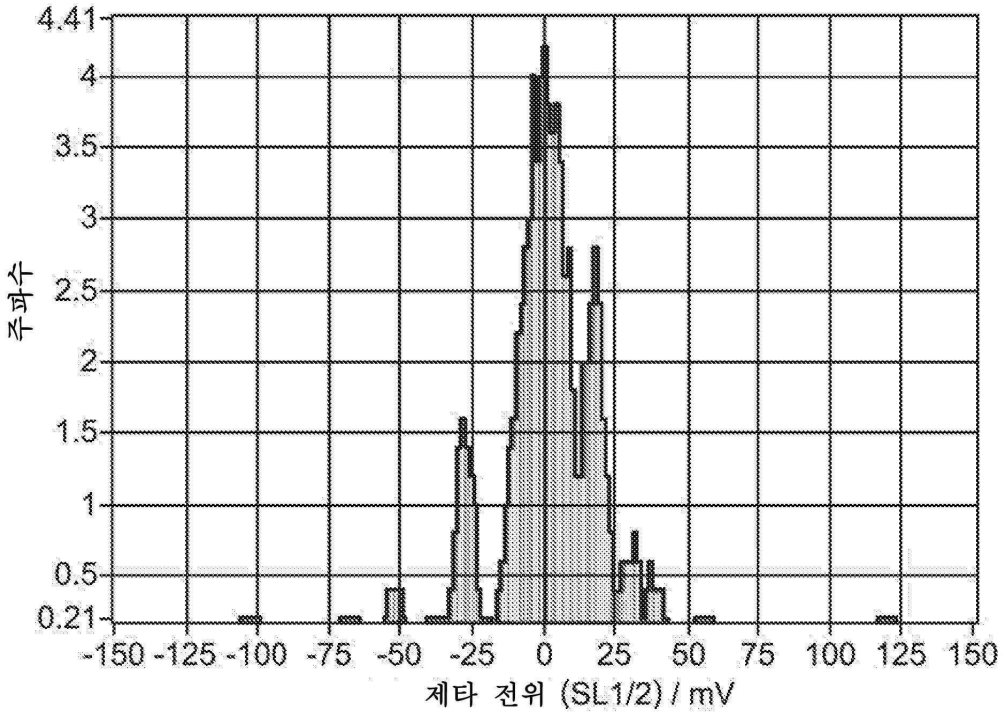


피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
85.1	4.7	53.1	41.8
14.2	4.4	16.7	49.9
220.3	1.7	94.2	8.3

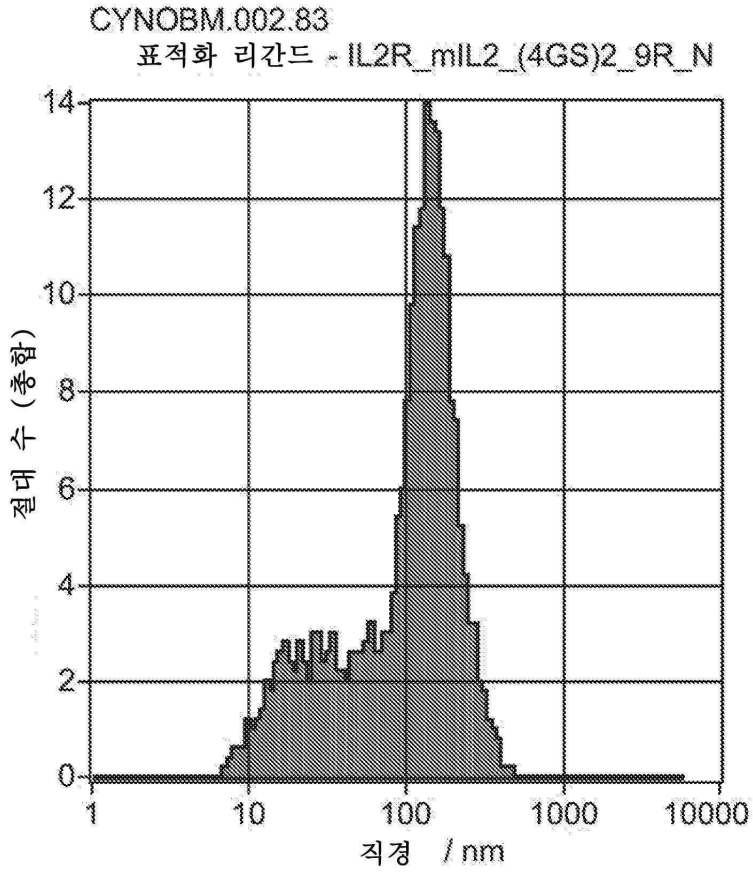
X 값	수	농도	부피
X10	8.3	8.3	123.5
X50	30.1	30.1	285.3
X90	132.2	132.2	439.2
너비	4.1	4.1	1.1
평균	61.4	61.4	307.4
표준편차	73.3	73.3	121.3

도면63b



이동도:	0.22 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.23 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 13.6 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: 2.96 ± 0.14 mV
제타 전위 분포:	2.96 mV FWHM 19.98 (SL1/2)
농도:	7.8E+6 입자 / mL

도면64a



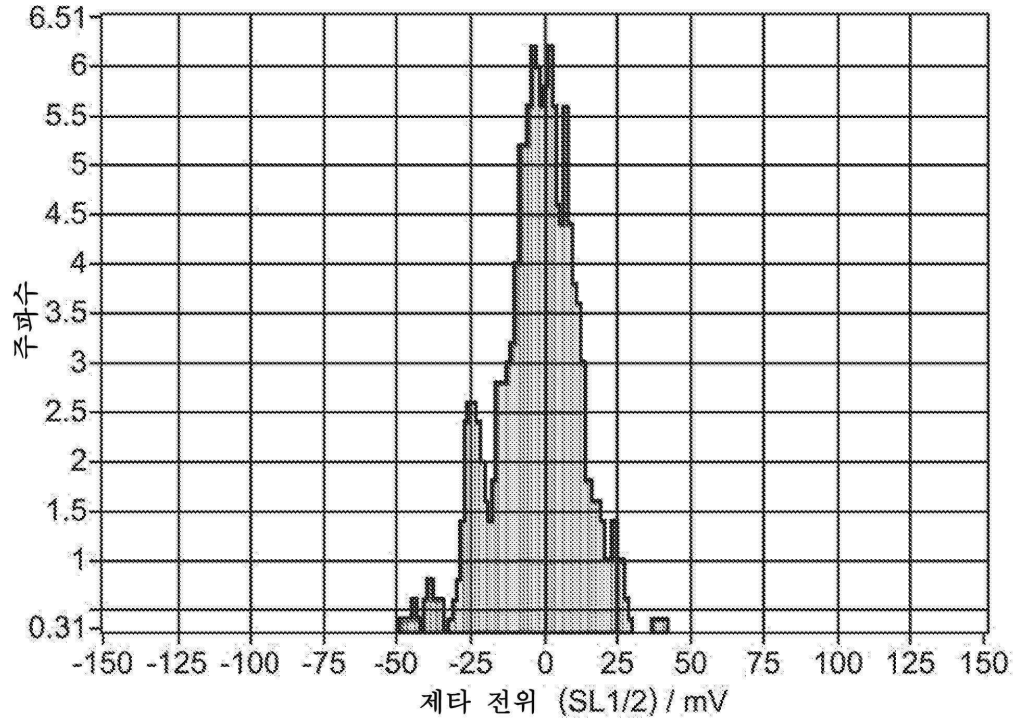
피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
145.8	13.7	110.9	79.1
29.8	2.6	27.6	20.9

X 값

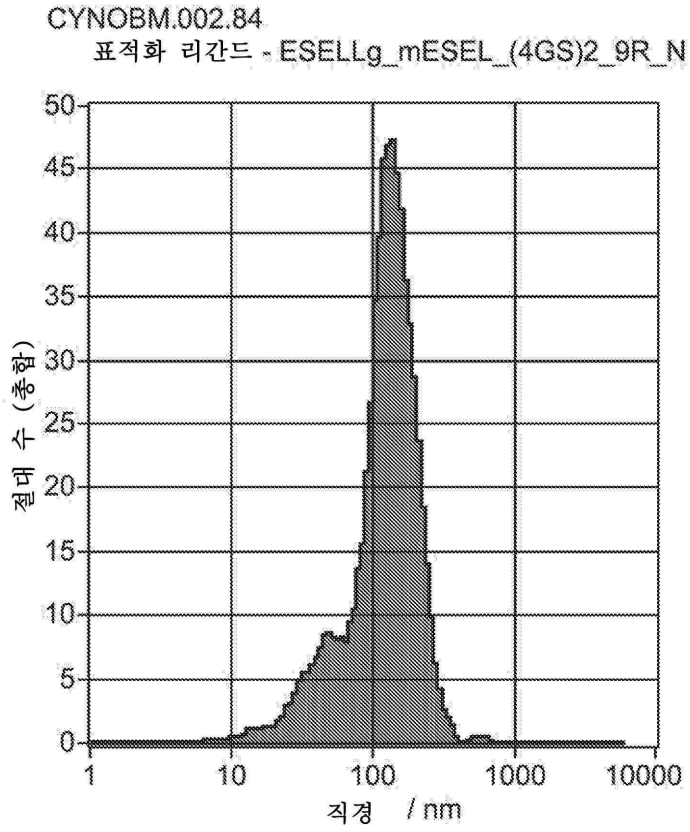
	수	농도	부피
X10	19.7	19.7	131.8
X50	120.6	120.6	214.2
X90	205.8	205.8	336.7
너비	1.5	1.5	1.0
평균	121.8	121.8	236.6
표준편차	77.0	77.0	86.7

도면64b



이동도:	-0.18 ± 0.02 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.19 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 13.6 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: -2.47 ± 0.33 mV
제타 전위 분포:	-2.47 mV FWHM 24.95 (SL1/2)
농도:	1.3E+7 입자 / mL

도면65a

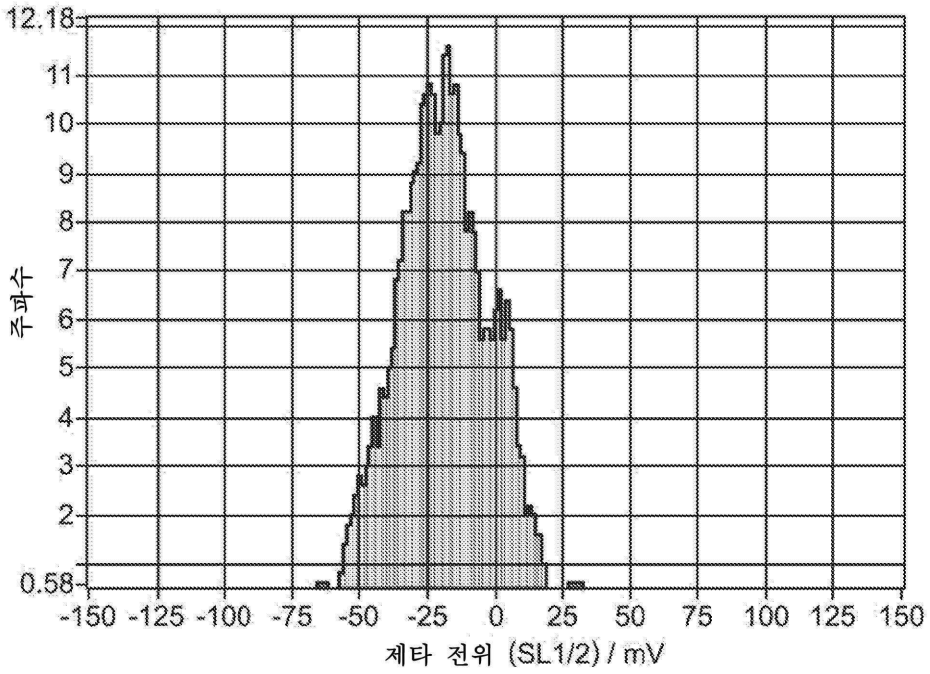


피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
137.3	47.1	115.7	100.0

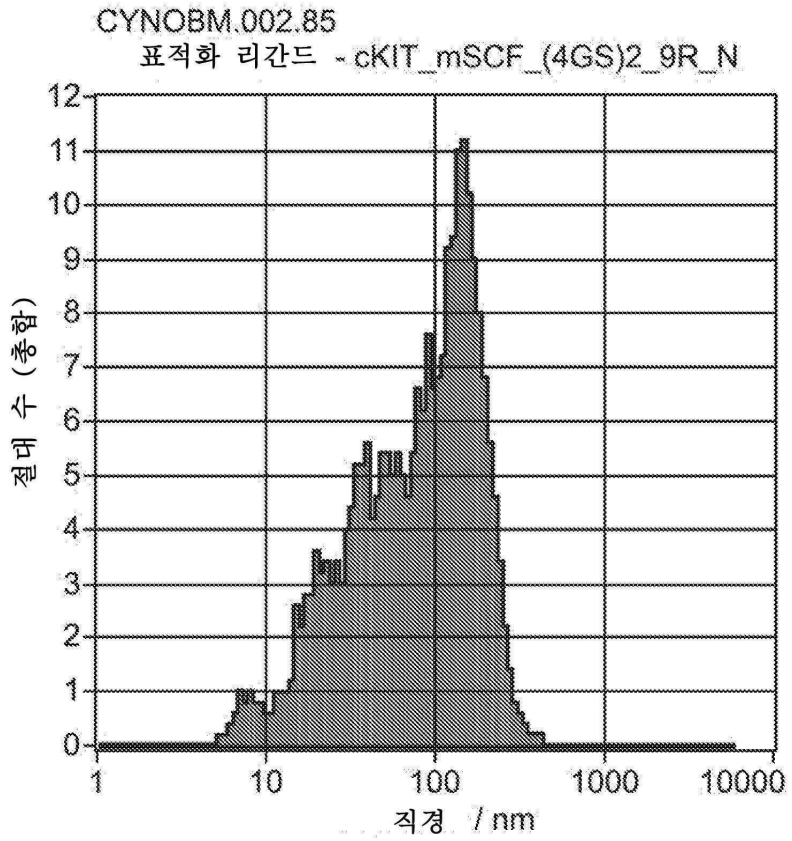
X 값	수	농도	부피
X10	46.9	46.9	124.0
X50	124.8	124.8	201.2
X90	204.3	204.3	534.7
너비	1.3	1.3	2.0
평균	132.8	132.8	249.1
표준편차	64.5	64.5	138.2

도면65b



이동도:	-1.33 ± 0.05 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1.41 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 13.6 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: -18.07 ± 0.71 mV
제타 전위 분포:	-18.07 mV FWHM 33.89 (SL1/2)
농도:	3.2E+7 입자 / mL

도면66a

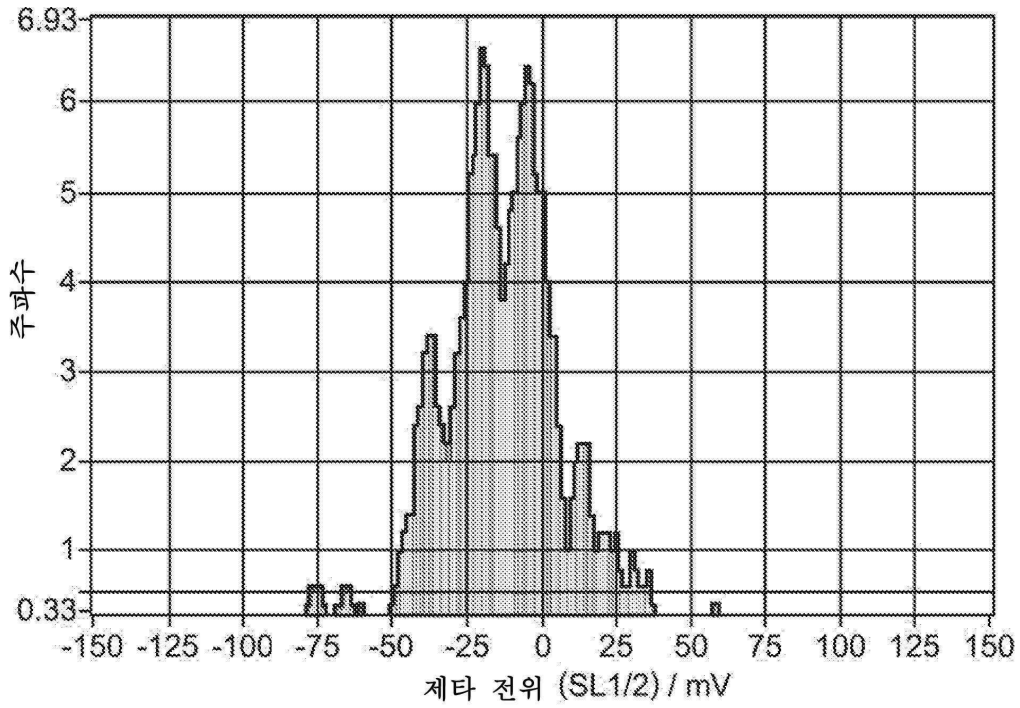


피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
145.1	11.1	135.0	69.8
46.5	4.7	27.3	30.2

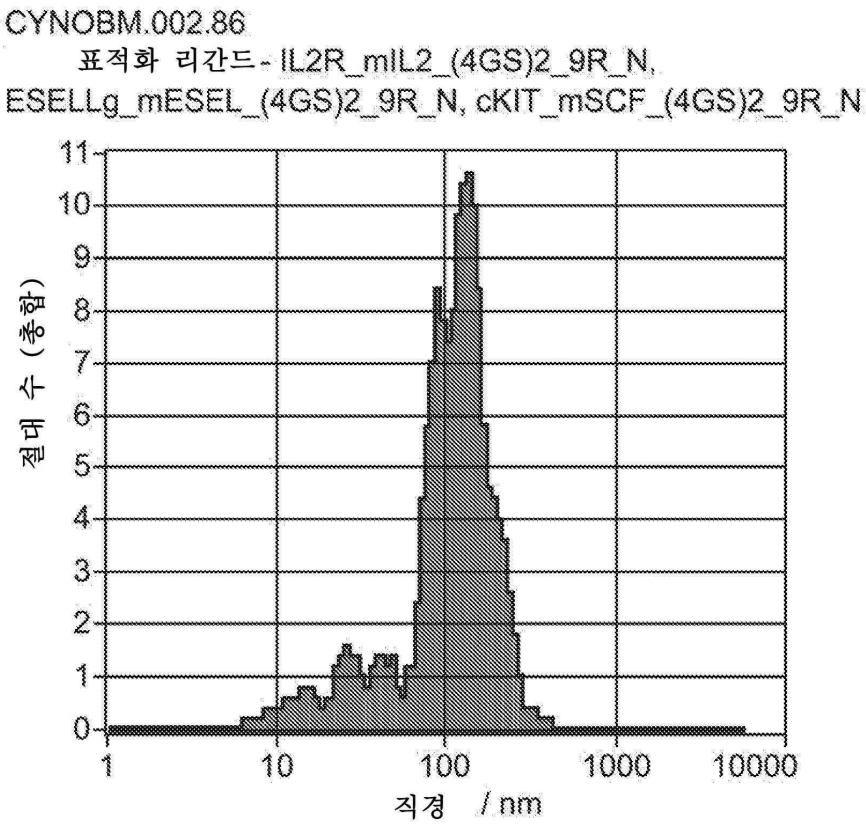
X 값	수	농도	부피
X10	19.9	19.9	122.4
X50	85.8	85.8	189.5
X90	186.0	186.0	287.1
너비	1.9	1.9	0.9
평균	99.0	99.0	203.3
표준편차	67.7	67.7	70.4

도면66b



이동도:	-0.93 ± 0.02 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.98 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 13.6 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: -12.54 ± 0.25 mV
제타 전위 분포:	-12.54 mV FWHM 11.66 (SL1/2)
농도:	1.2E+7 입자 / mL

도면67a

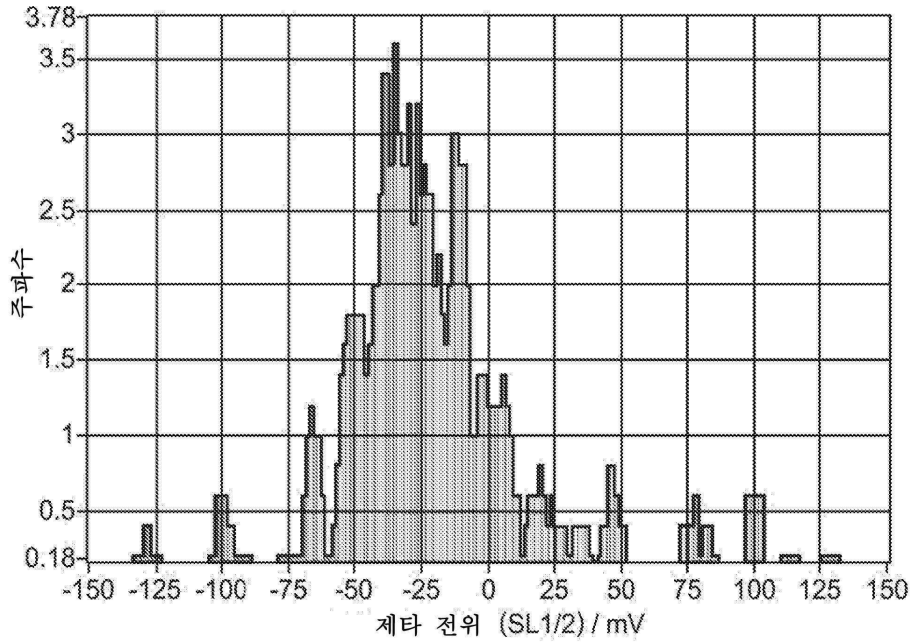


피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
126.5			
30.4	10.2	98.1	84.7
	1.4	12.9	15.3

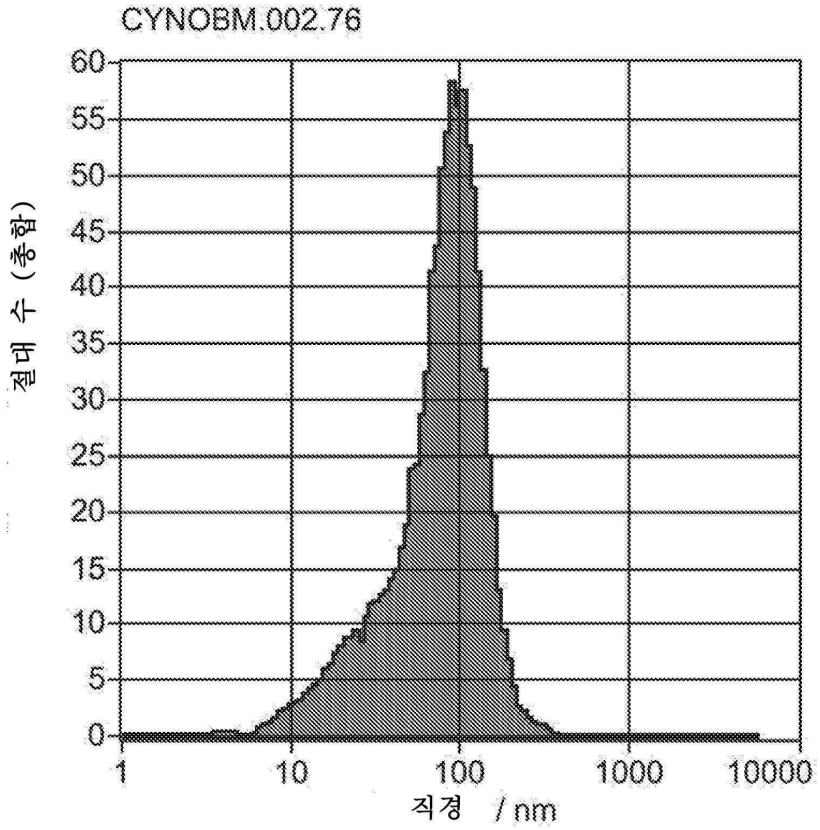
X 값	수	농도	부피
X10	30.0	30.0	117.0
X50	115.1	115.1	189.6
X90	194.4	194.4	297.0
너비	1.4	1.4	0.9
평균	118.8	118.8	202.2
표준편차	61.2	61.2	75.1

도면67b



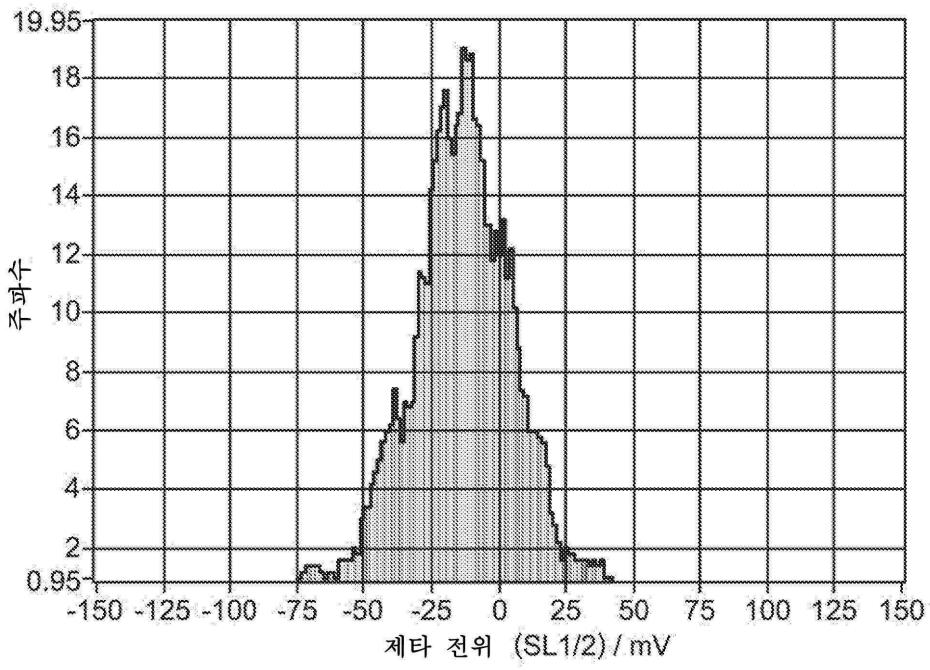
이동도:	-1.47 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1.56 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 13.6 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: -20.02 ± 0.10 mV
제타 전위 분포:	-20.02 mV FWHM 26.45 (SL1/2)
농도:	3.7E+7 입자 / mL

도면68a



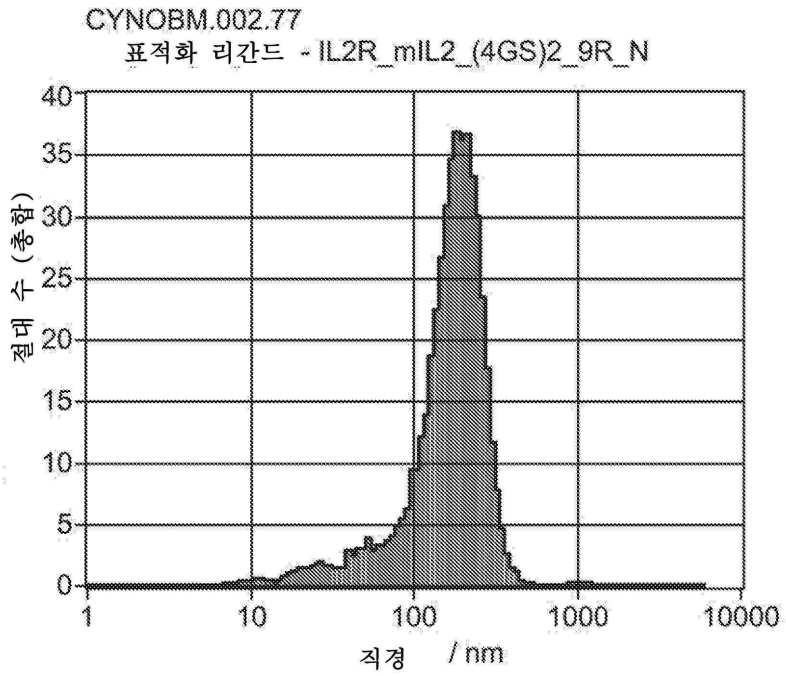
피크 분석 (절대 수)			
직경 / nm		절대수	FWHM / nm	백분율
96.7		56.8	82.4	100.0
X 값	수		농도	부피
X10	25.8		25.8	84.3
X50	80.6		80.6	132.8
X90	134.9		134.9	263.9
너비	1.4		1.4	1.4
평균	85.6		85.6	153.4
표준편차	44.9		44.9	64.4

도면68b



이동도:	-0.89 ± 0.04 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.94 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 13.5 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: -12.02 ± 0.59 mV
제타 전위 분포:	-12.02 mV FWHM 39.15 (SL1/2)
농도:	5.1E+7 입자 / mL

도면69

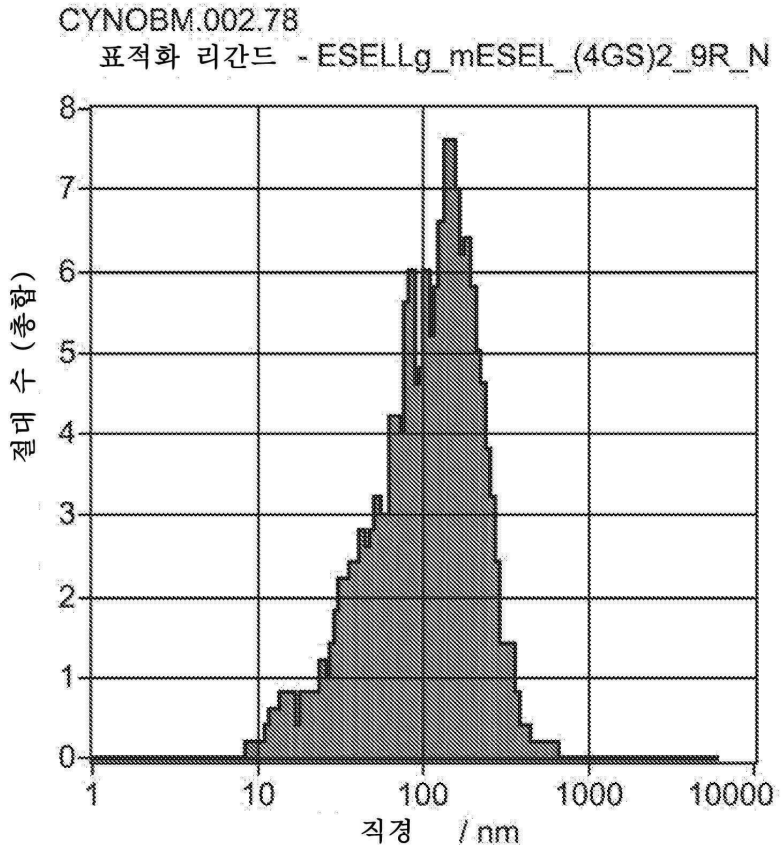


피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
193.2	36.4	145.6	100.0

X 값	수	농도	부피
X10	70.1	70.1	166.5
X50	171.6	171.6	250.9
X90	253.6	253.6	999.6
너비	1.1	1.1	3.3
평균	176.1	176.1	415.4
표준편차	82.1	82.1	330.0

도면70a

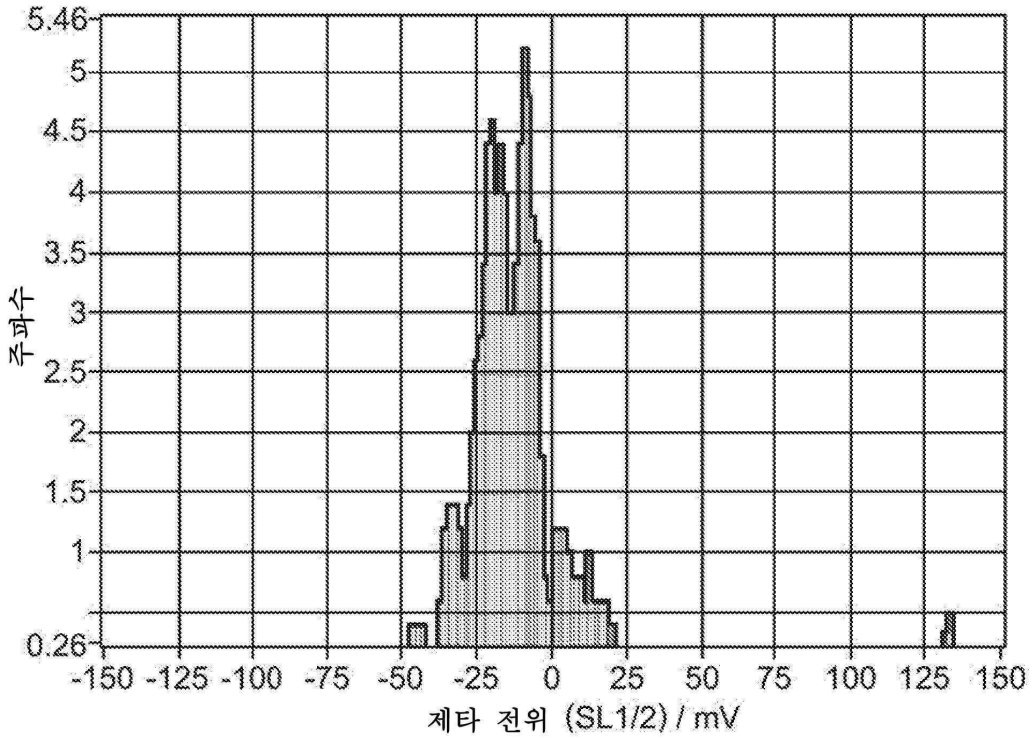


피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
152.0	7.4	178.1	100.0

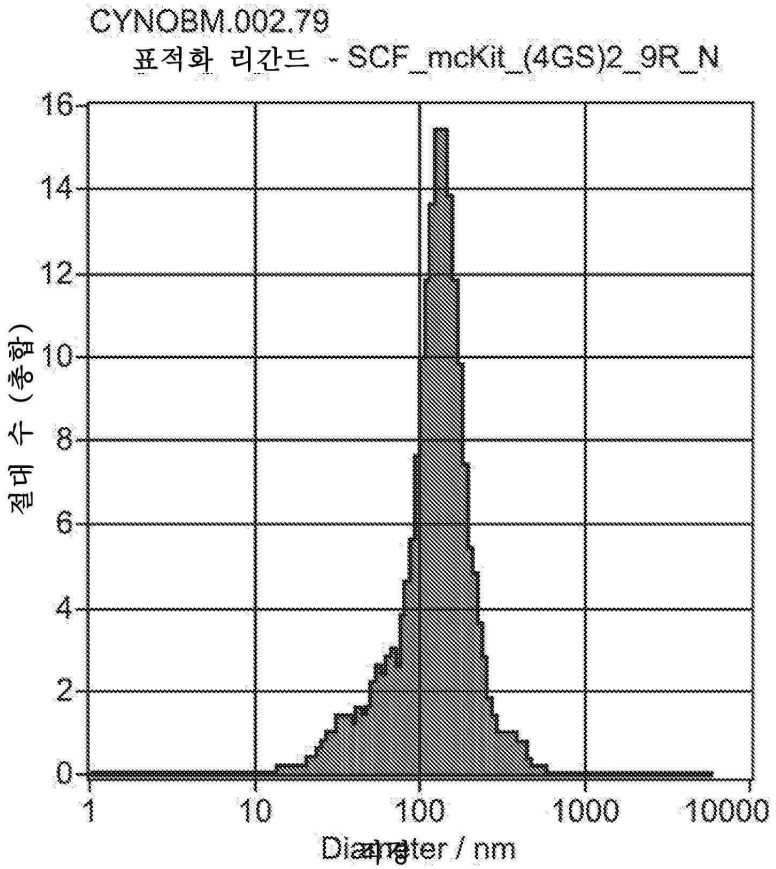
X 값	수	농도	부피
X10	33.1	33.1	141.5
X50	113.1	113.1	254.4
X90	222.1	222.1	534.3
너비	1.7	1.7	1.5
평균	126.4	126.4	302.3
표준편차	83.9	83.9	142.8

도면70b



이동도:	-0.87 ± 0.06 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.91 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 13.5 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: -11.72 ± 0.79 mV
제타 전위 분포:	-11.72 mV FWHM 10.76 (SL1/2)
농도:	7.1E+6 입자 / mL

도면71

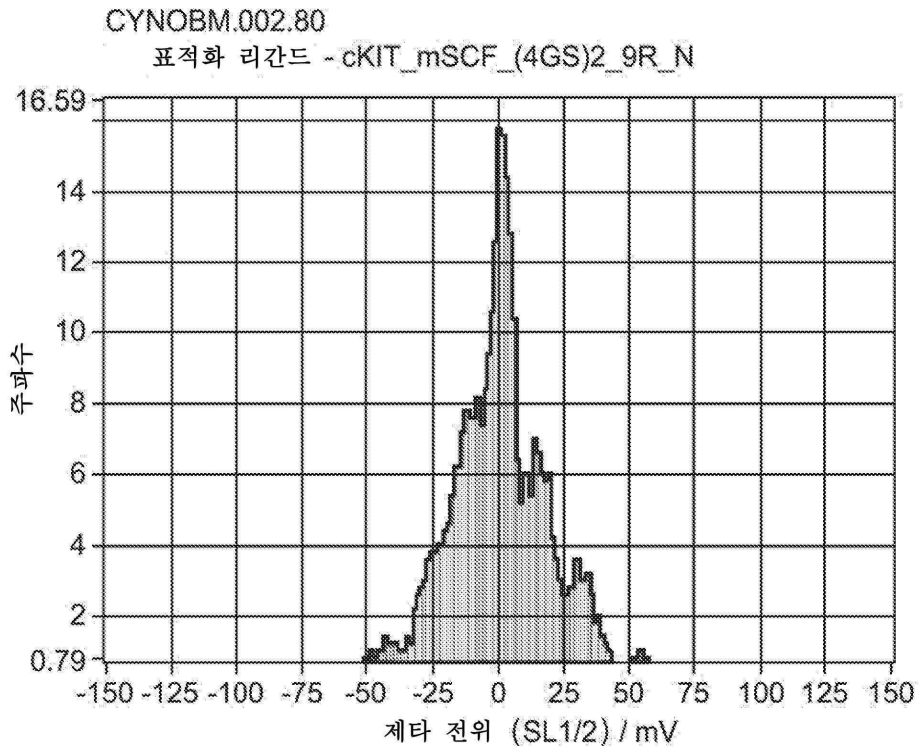


피크 분석 (절대 수)

직경 / nm	절대수	FWHM / nm	백분율
134.2	15.4	83.1	100.0

X 값	수	농도	부피
X10	56.3	56.3	124.8
X50	125.0	125.0	221.3
X90	199.9	199.9	456.5
너비	1.1	1.1	1.5
평균	135.2	135.2	263.1
표준편차	67.6	67.6	120.8

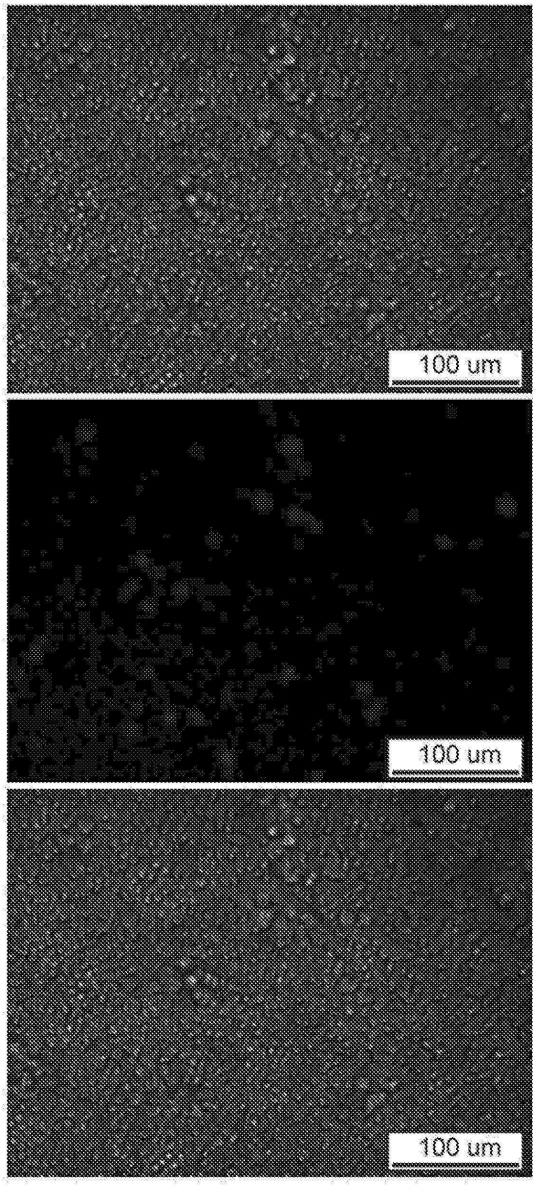
도면72



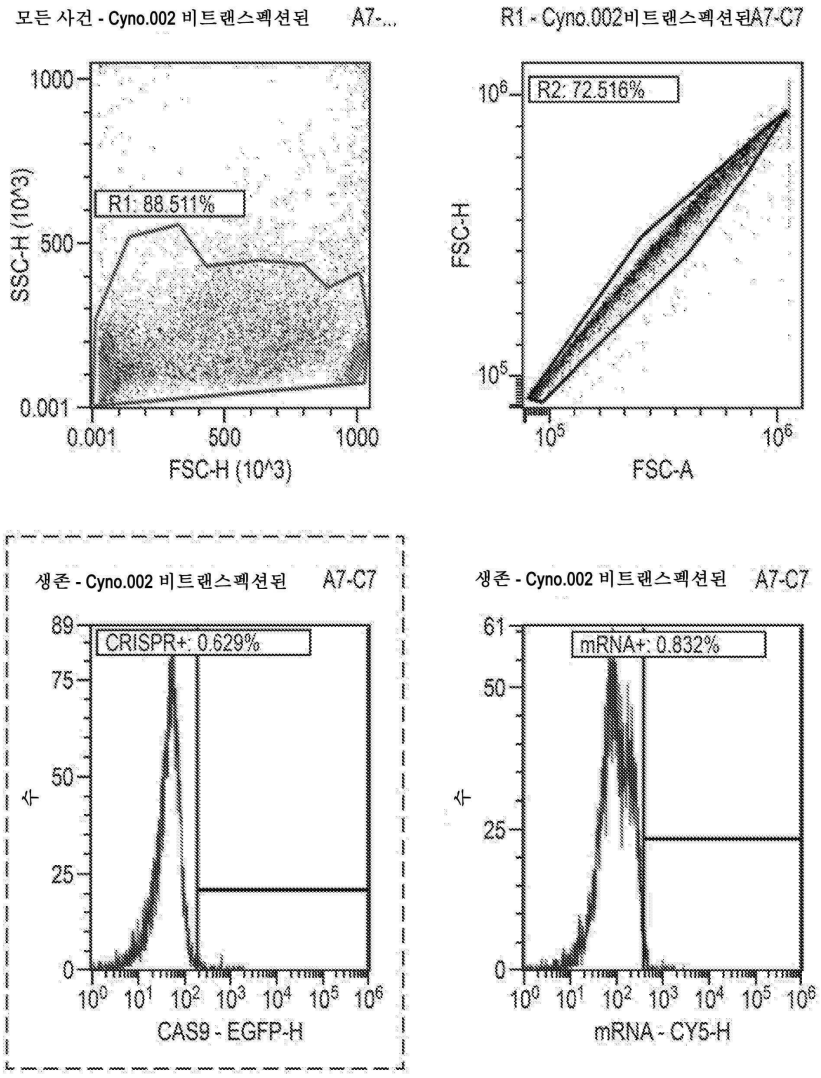
이동도:	0.10 ± 0.12 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.11 µm/sec/V/cm
ZP 인자: 13.5 (스몰루호프스키)	
제타 전위	@ 25°C: 1.36 ± 1.69 mV
제타 전위 분포:	1.36 mV FWHM 12.99 (SL1/2)
농도:	2.5E+7 입자 / mL

도면73a

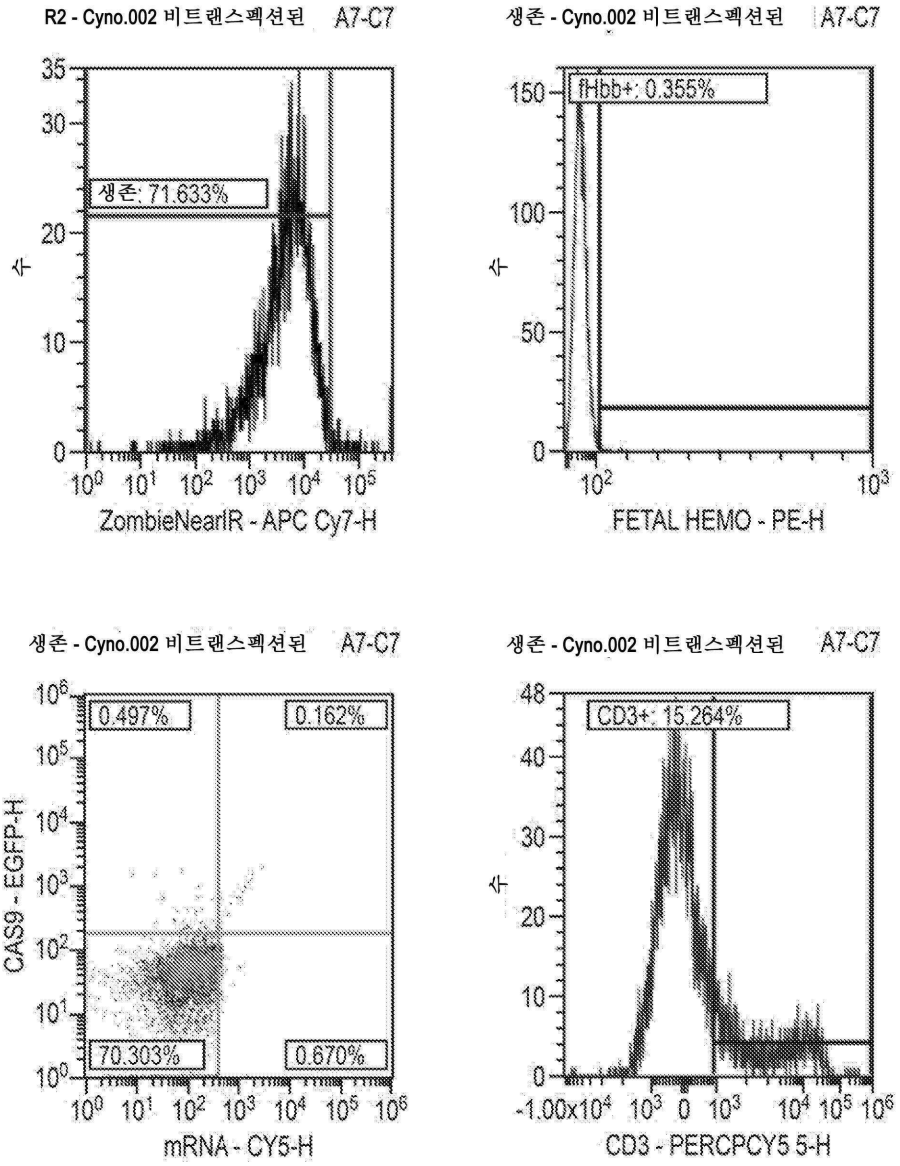
CynoBM.002 비트랜스펙션된 대조군



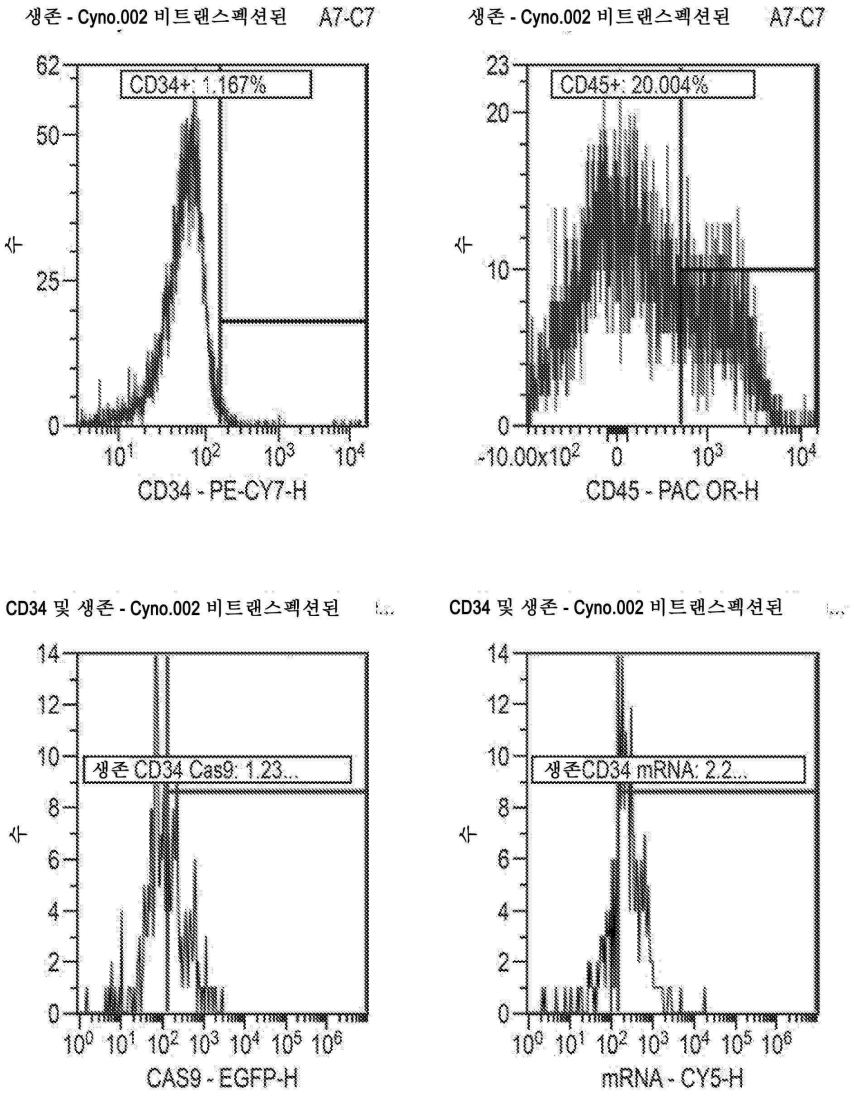
도면73b


모든 사건 - Cyno.002 비트랜스펙션된 A7-...
R1: 88.511%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002비트랜스펙션된A7-C7
R2: 72.516%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002 비트랜스펙션된 A7-C7
CRISPR+: 0.629%
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002 비트랜스펙션된 A7-C7
mRNA+: 0.832%
수
mRNA - CY5-H

도면73c

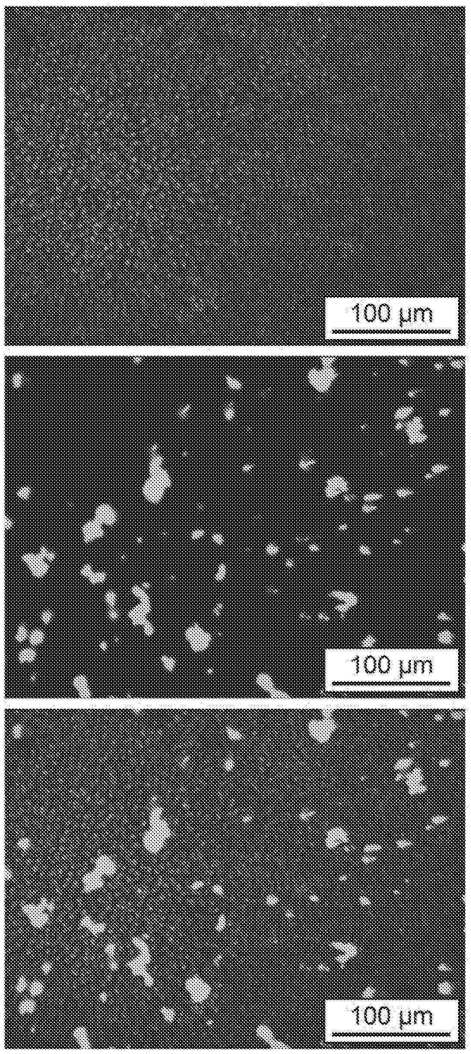

R2 - Cyno.002 비트랜스펙션된 A7-C7
생존: 71.633%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002 비트랜스펙션된 A7-C7
fHbb+: 0.355%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002 비트랜스펙션된 A7-C7
0.497%
0.162%
70.303%
0.670%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002 비트랜스펙션된 A7-C7
CD3+: 15.264%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

도면73d

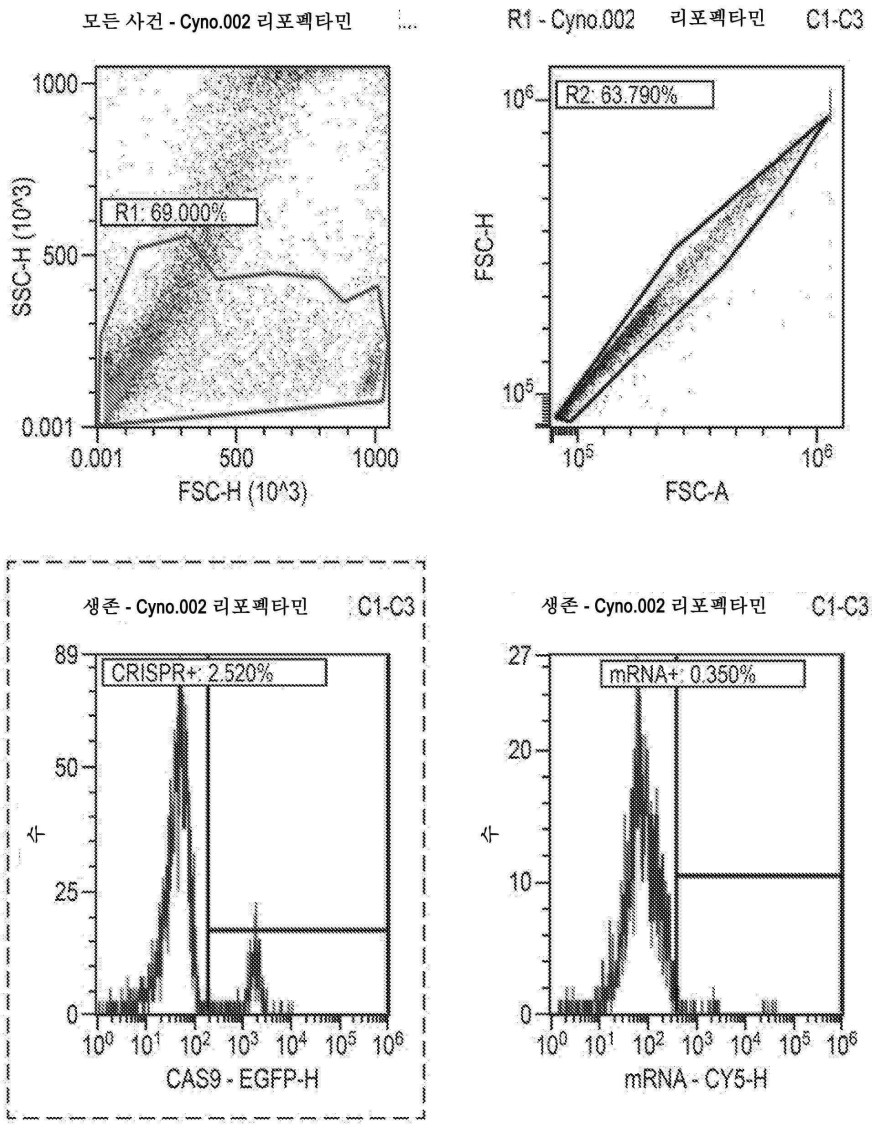

생존 - Cyno.002 비트랜스펙션된 A7-C7
CD34+: 1.167%
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002 비트랜스펙션된 A7-C7
CD45+: 20.004%
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002 비트랜스펙션된
생존 CD34 Cas9: 1.23...
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002 비트랜스펙션된
생존CD34 mRNA: 2.2...
mRNA - CY5-H

도면74a

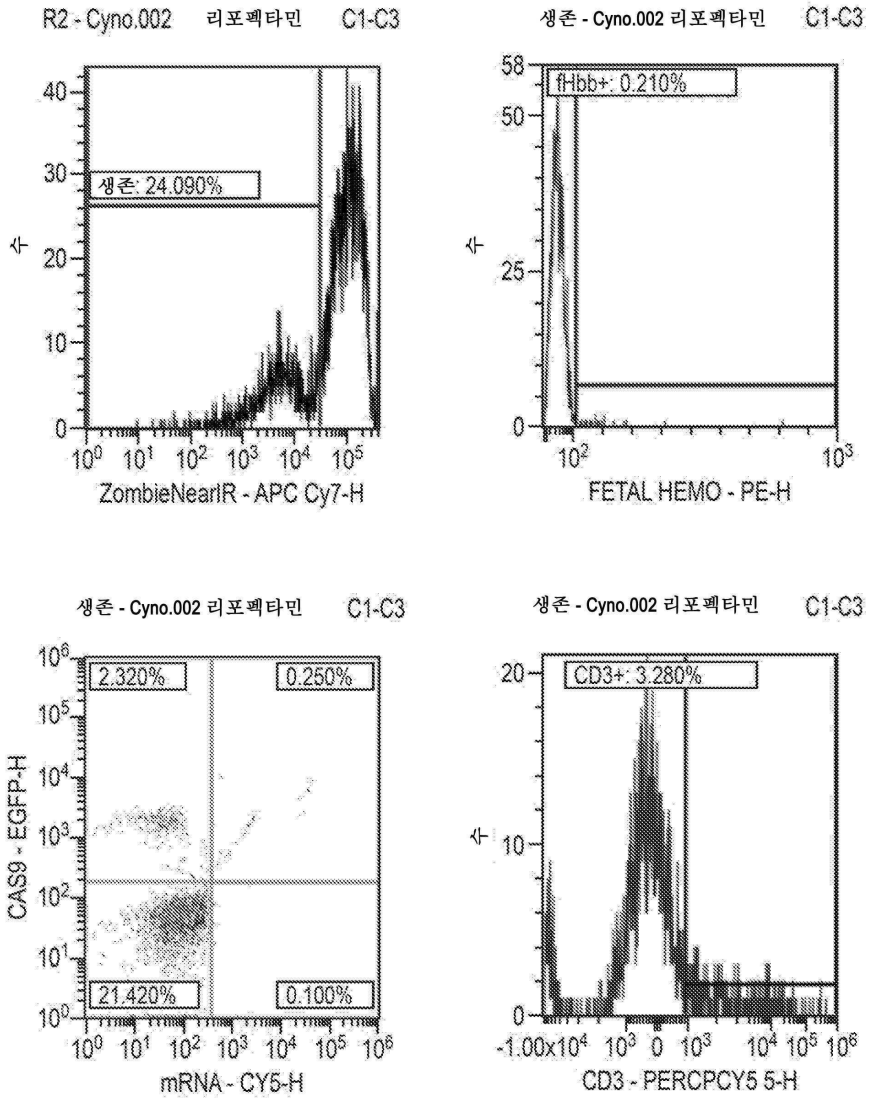
CynoBM.002 리포펙타민 CRISPRMAX



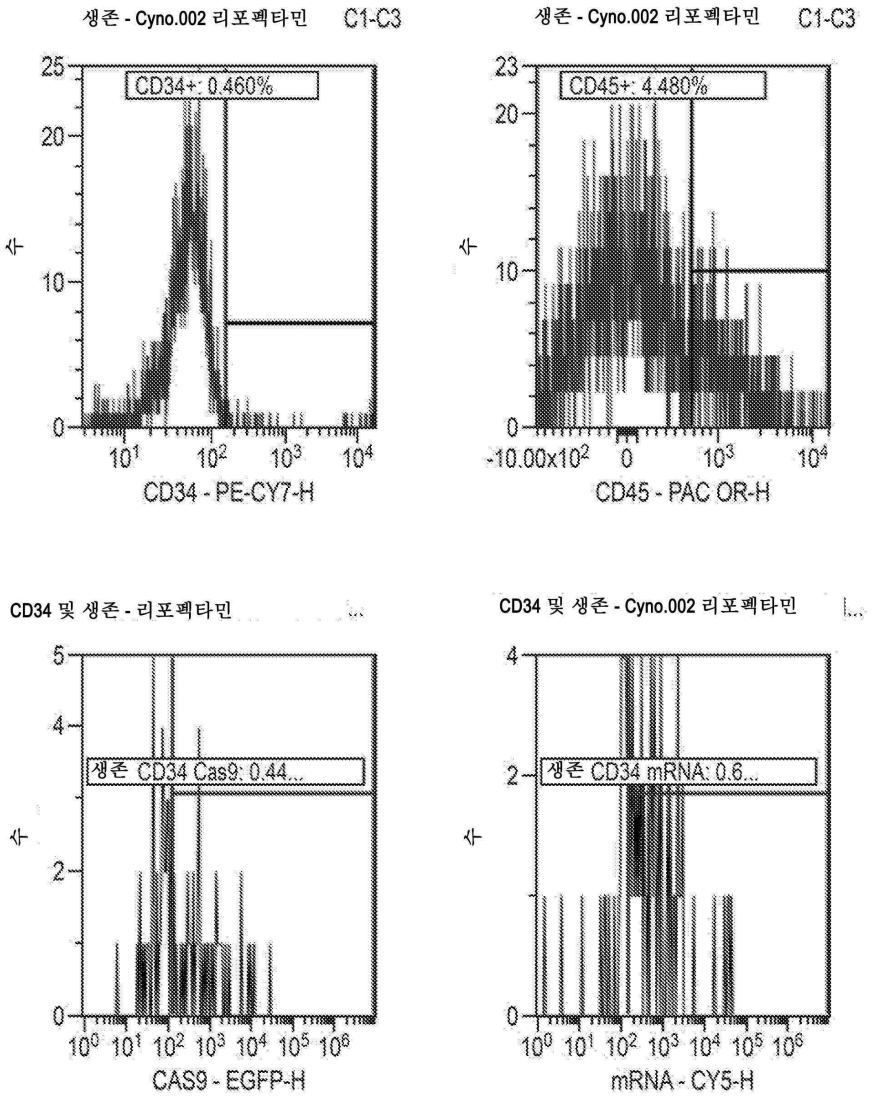
도면74b


모든 사건 - Cyno.002 리포펙타민
R1 - Cyno.002 리포펙타민 C1-C3
R1: 69.000%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R2: 63.790%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002 리포펙타민 C1-C3
CRISPR+: 2.520%
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002 리포펙타민 C1-C3
mRNA+: 0.350%
mRNA - CY5-H

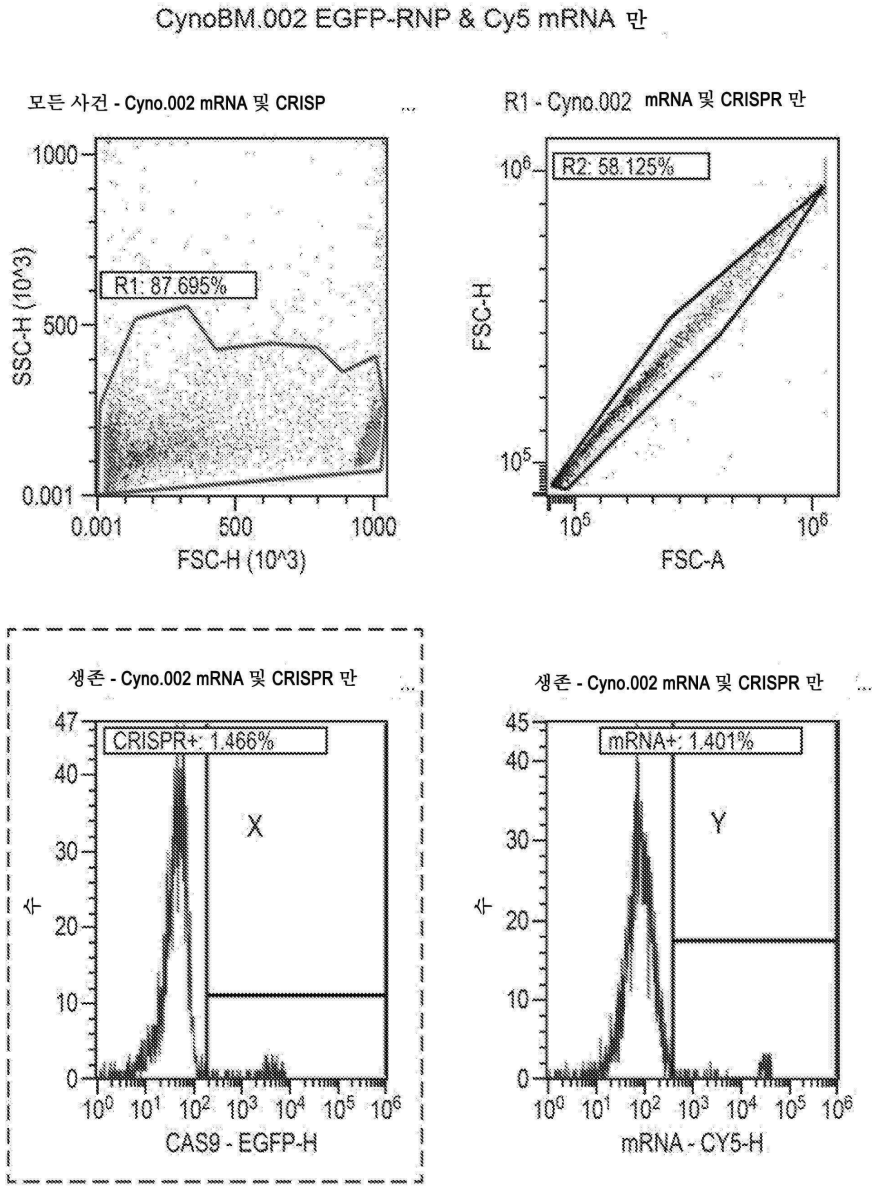
도면74c


R2 - Cyno.002 리포펙타민 C1-C3
생존: 24.090%
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002 리포펙타민 C1-C3
fHbb+: 0.210%
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002 리포펙타민 C1-C3
2.320%
0.250%
21.420%
0.100%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002 리포펙타민 C1-C3
CD3+: 3.280%
CD3 - PERCPCY5 5-H

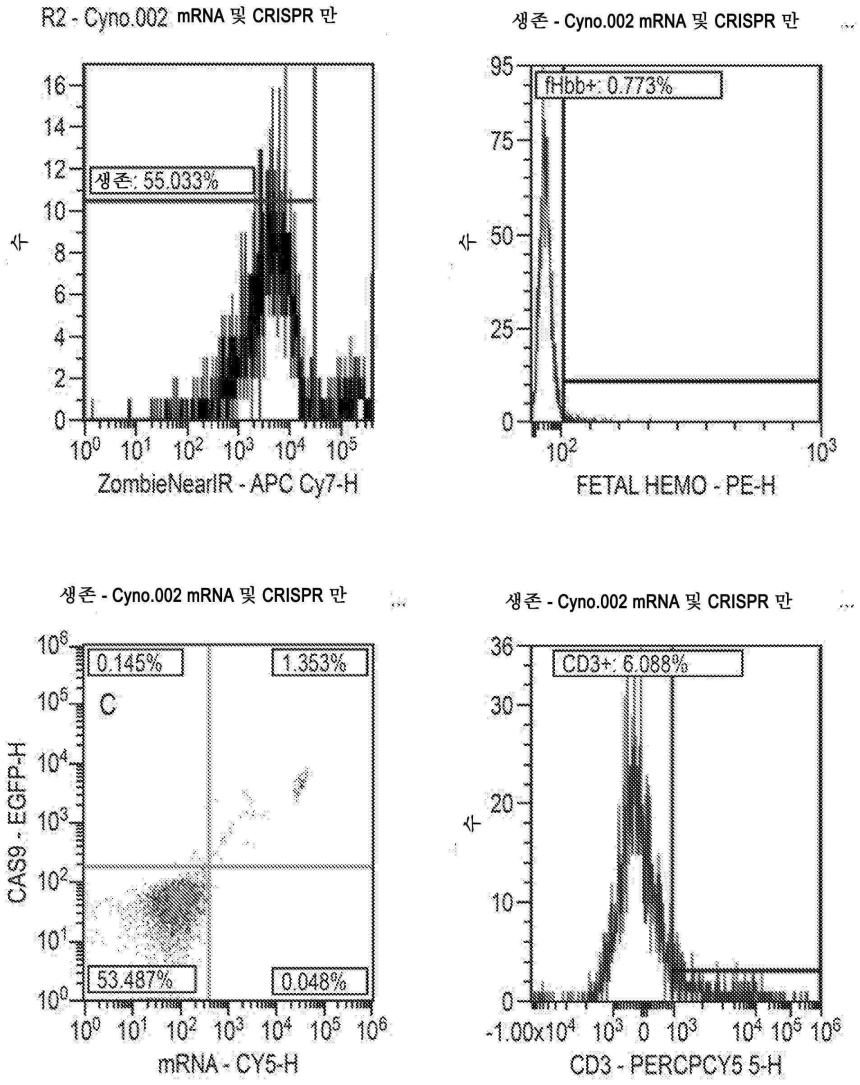
도면74d


생존 - Cyno.002 리포펙타민 C1-C3
CD34+: 0.460%
수
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002 리포펙타민 C1-C3
CD45+: 4.480%
수
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - 리포펙타민
생존 CD34 Cas9: 0.44...
수
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002 리포펙타민
생존 CD34 mRNA: 0.6...
수
mRNA - CY5-H

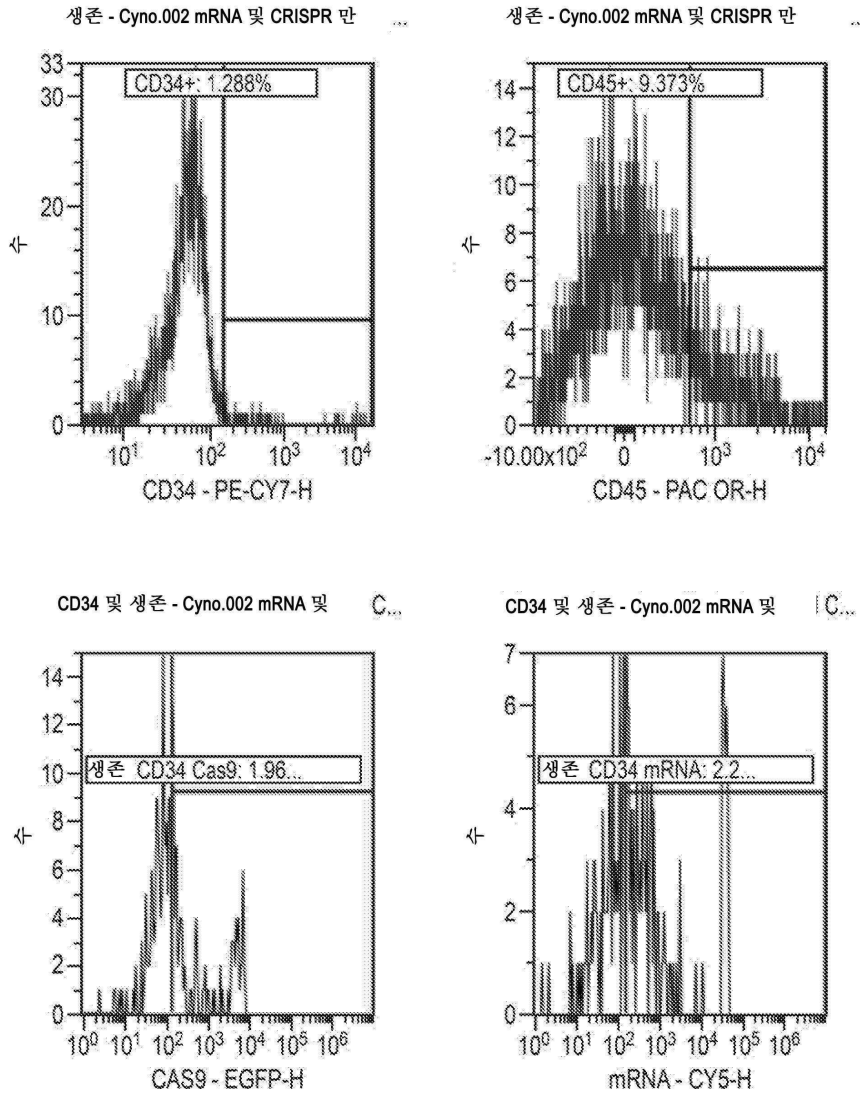
도면75a


CynoBM.002 EGFP-RNP & Cy5 mRNA 만
모든 사건 - Cyno.002 mRNA 및 CRISP
R1: 87.695%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002 mRNA 및 CRISPR 만
R2: 58.125%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002 mRNA 및 CRISPR 만
CRISPR+: 1.466%
X
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002 mRNA 및 CRISPR 만
mRNA+: 1.401%
Y
수
mRNA - CY5-H

도면75b

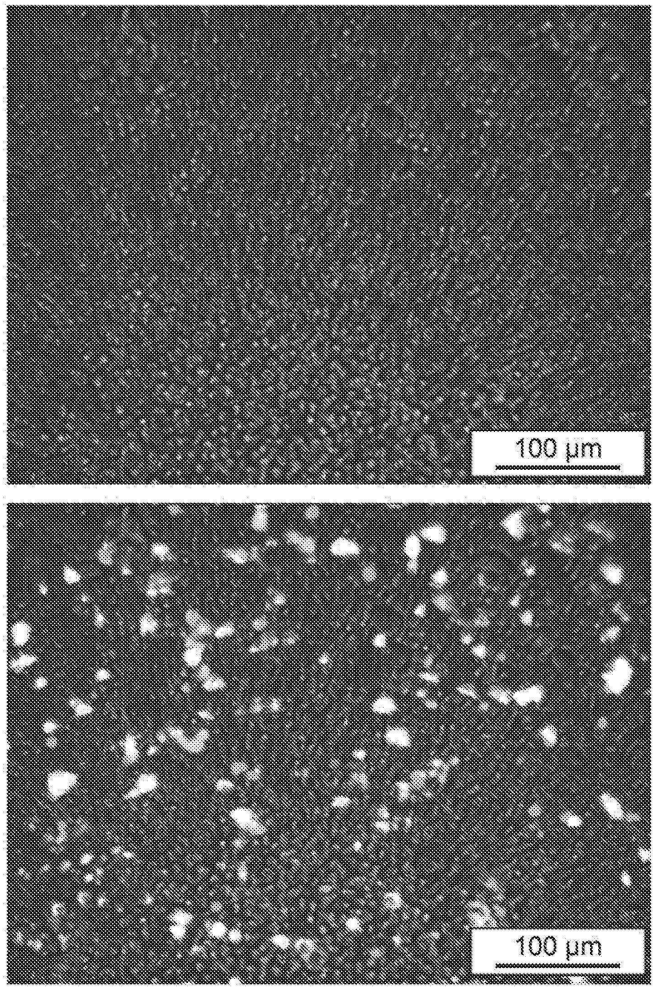

R2 - Cyno.002 mRNA 및 CRISPR 만
생존: 55.033%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002 mRNA 및 CRISPR 만
fHbb+: 0.773%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002 mRNA 및 CRISPR 만
0.145%
1.353%
C
53.487%
0.048%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002 mRNA 및 CRISPR 만
CD3+: 6.088%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

도면75c

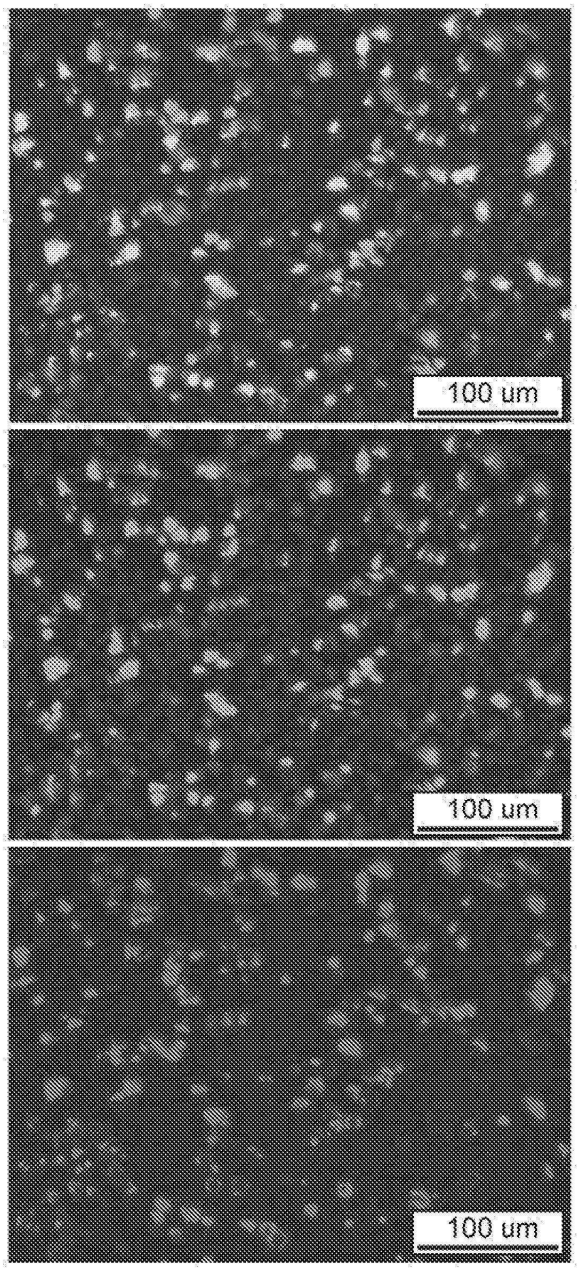

생존 - Cyno.002 mRNA 및 CRISPR 만
CD34+: 1.288%
수
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002 mRNA 및 CRISPR 만
CD45+: 9.373%
수
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002 mRNA 및
생존 CD34 Cas9: 1.96...
수
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002 mRNA 및
생존 CD34 mRNA: 2.2...
수
mRNA - CY5-H

도면76a

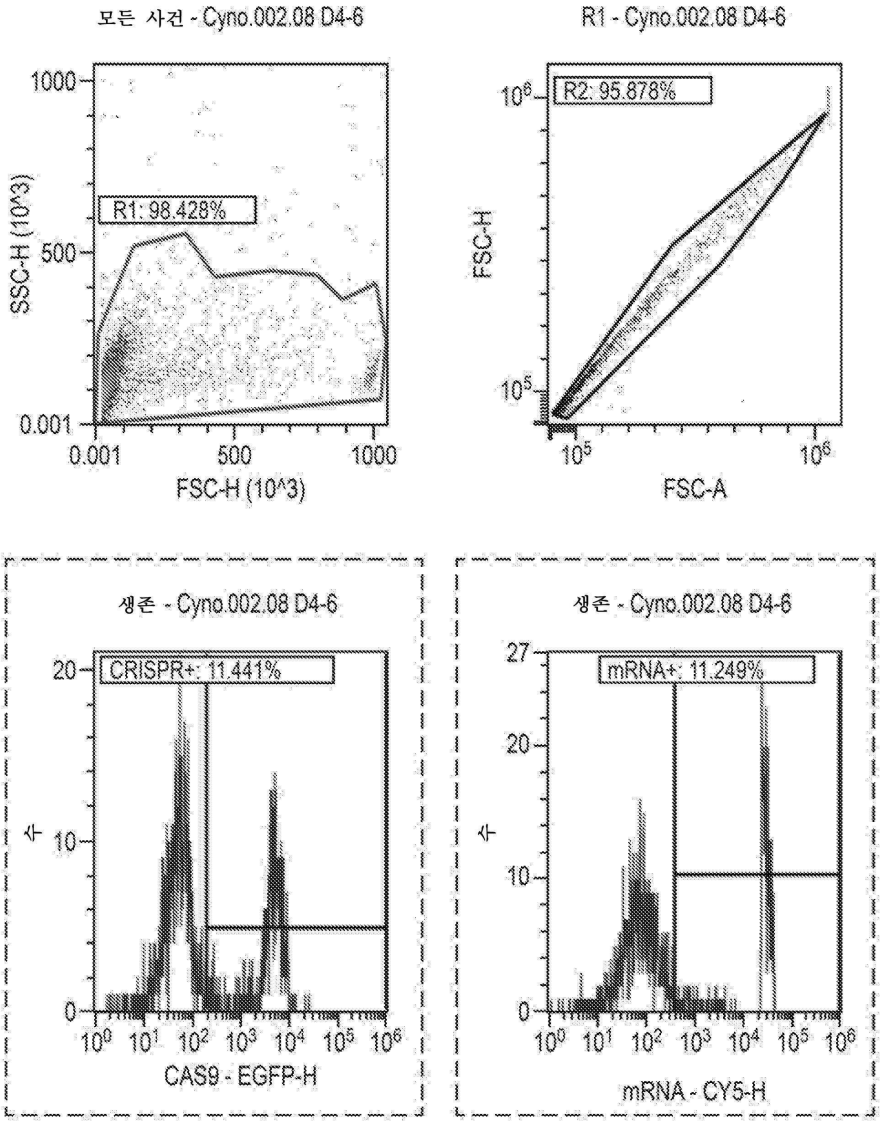
CynoBM.002.82



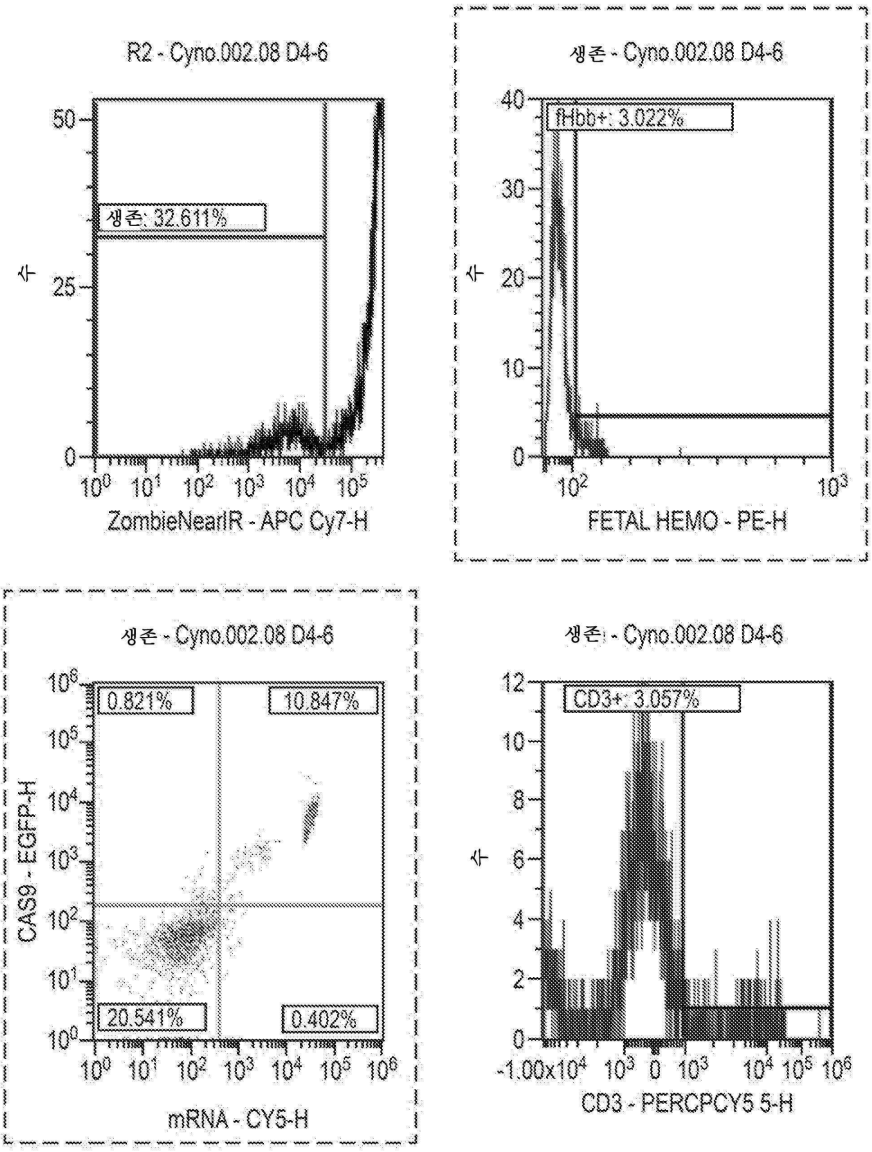
도면76b



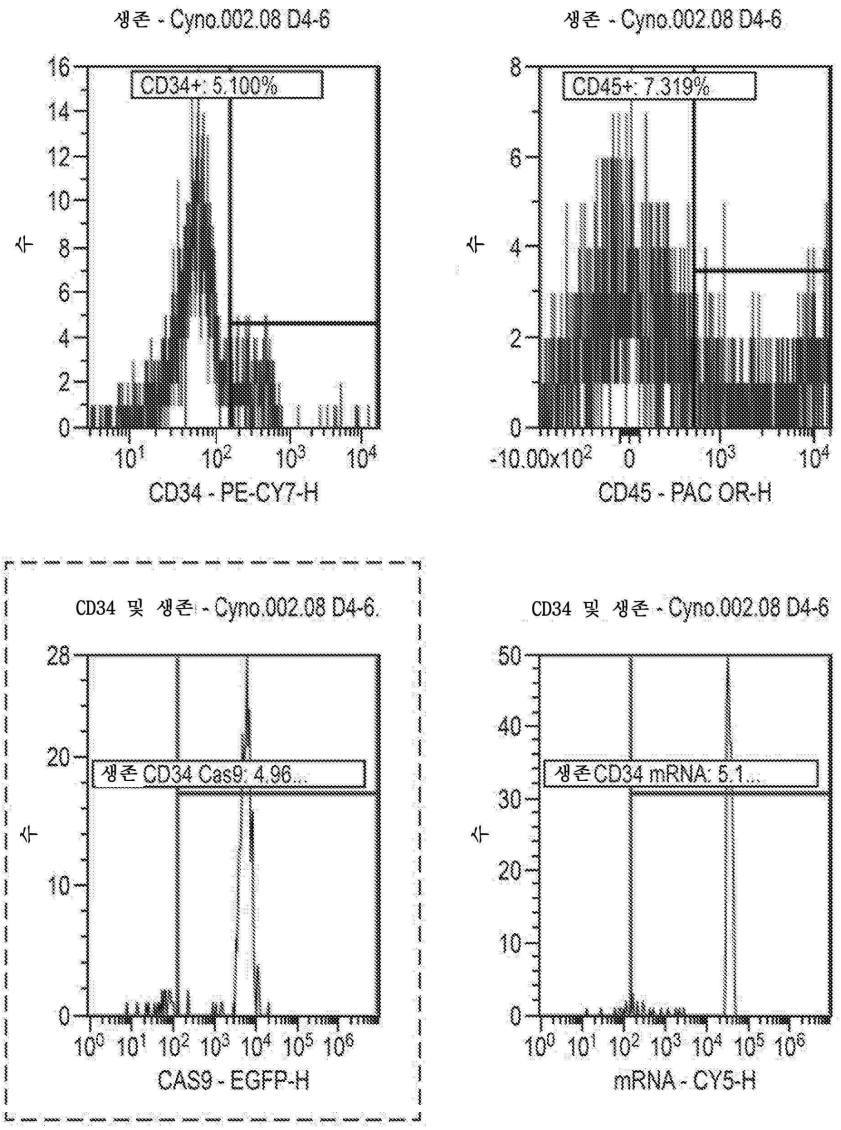
도면76c


모든 사건 - Cyno.002.08 D4-6
R1: 98.428%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002.08 D4-6
R2: 95.878%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002.08 D4-6
CRISPR+: 11.441%
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002.08 D4-6
mRNA+: 11.249%
수
mRNA - CY5-H

도면76d

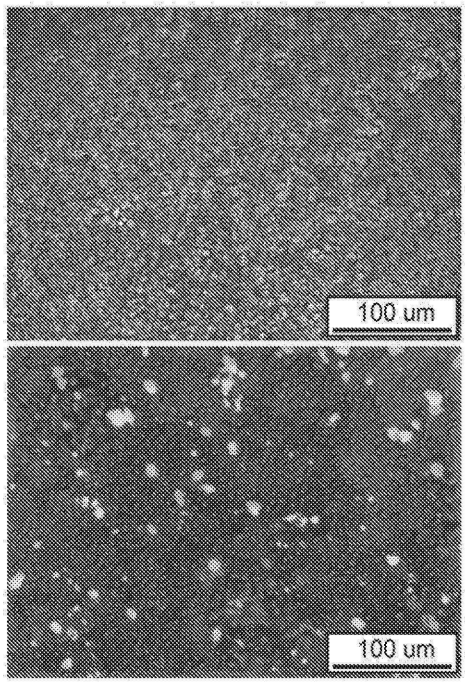

R2 - Cyno.002.08 D4-6
생존: 32.611%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002.08 D4-6
fHbb+: 3.022%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002.08 D4-6
0.821%
10.847%
20.541%
0.402%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002.08 D4-6
CD3+: 3.057%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

도면76e

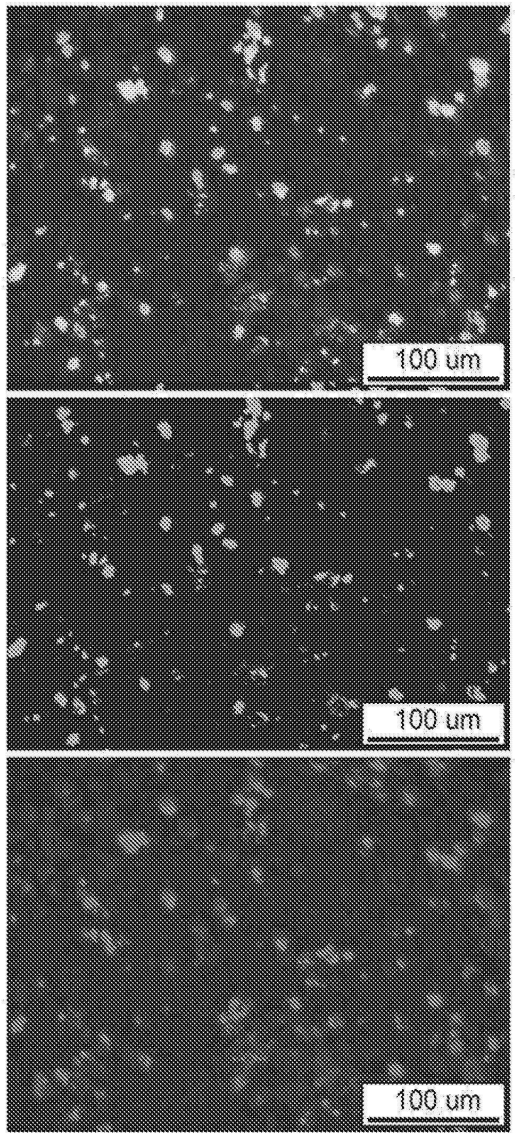

생존 - Cyno.002.08 D4-6
CD34+: 5.100%
수
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002.08 D4-6
CD45+: 7.319%
수
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.08 D4-6.
생존 CD34 Cas9: 4.96...
수
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.08 D4-6
생존 CD34 mRNA: 5.1...
수
mRNA - CY5-H

도면77a

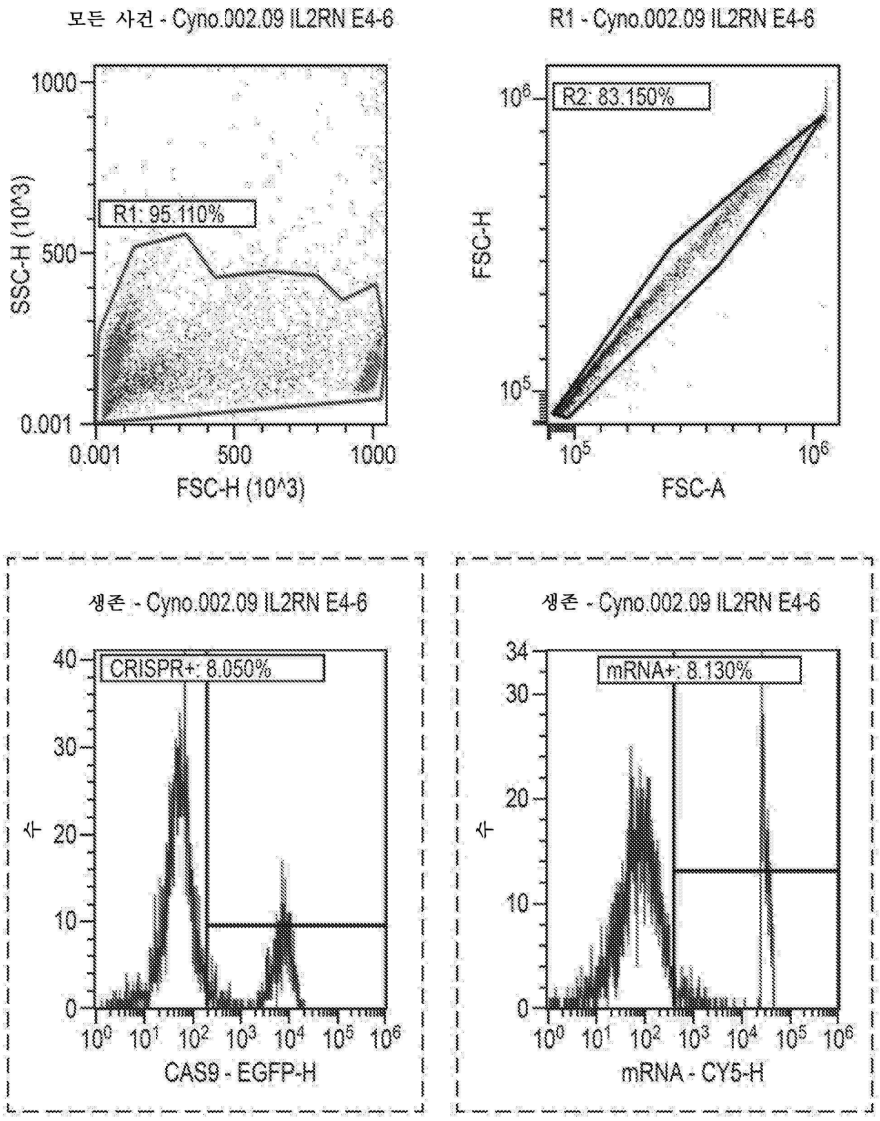
CynoBM.002.83



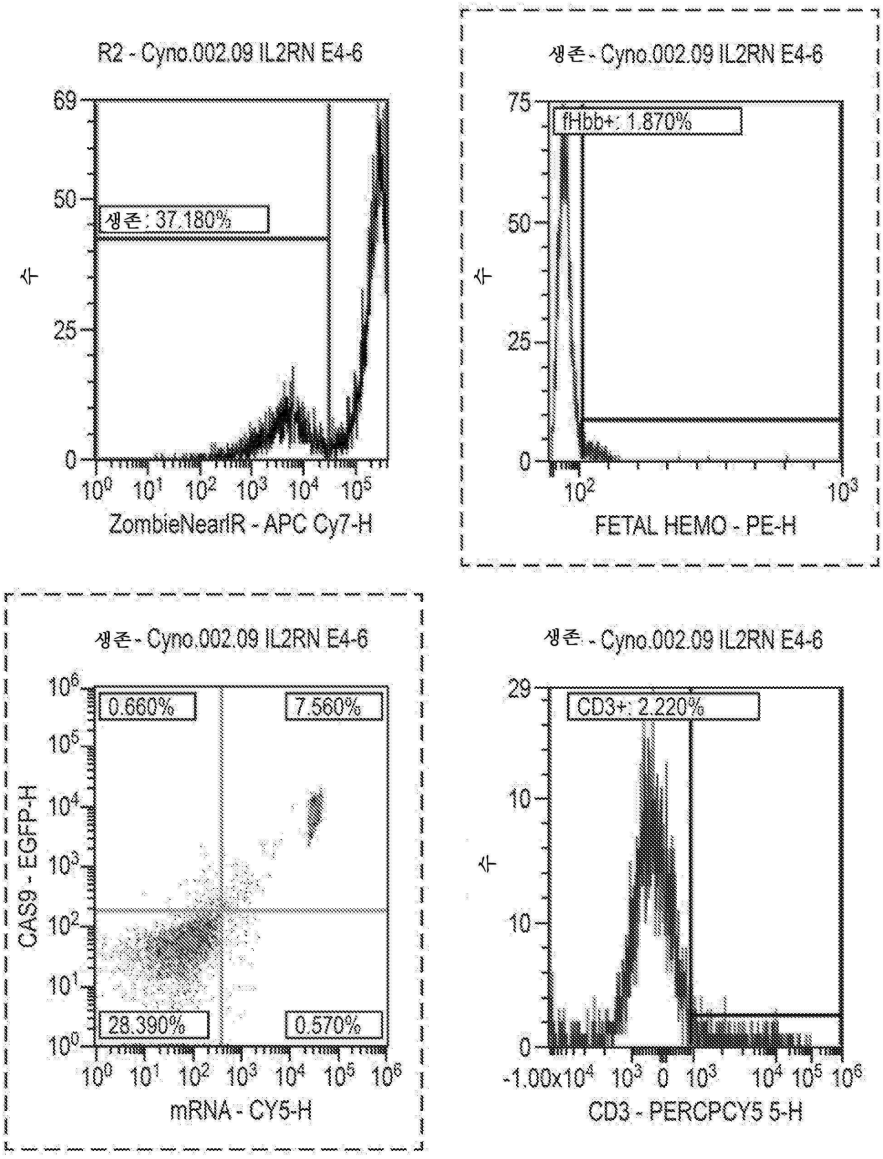
도면77b



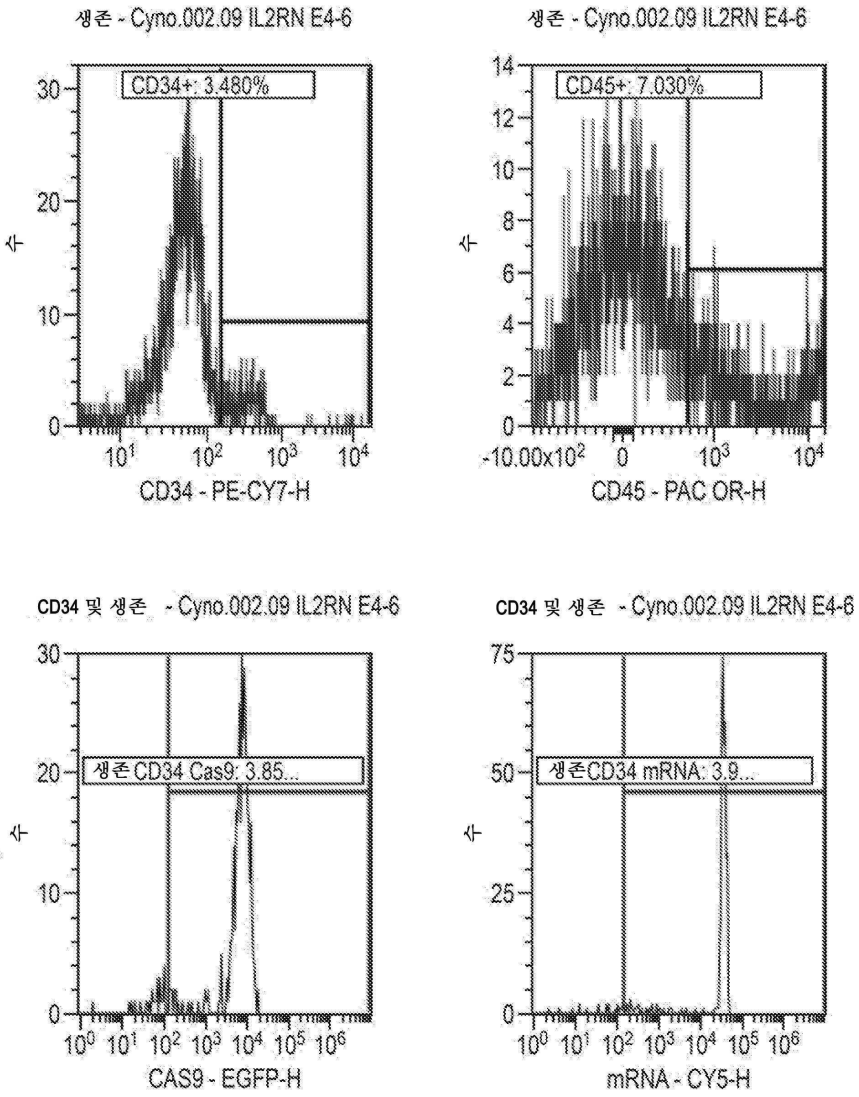
도면77c


모든 사건 - Cyno.002.09 IL2RN E4-6
R1: 95.110%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002.09 IL2RN E4-6
R2: 83.150%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002.09 IL2RN E4-6
CRISPR+: 8.050%
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002.09 IL2RN E4-6
mRNA+: 8.130%
수
mRNA - CY5-H

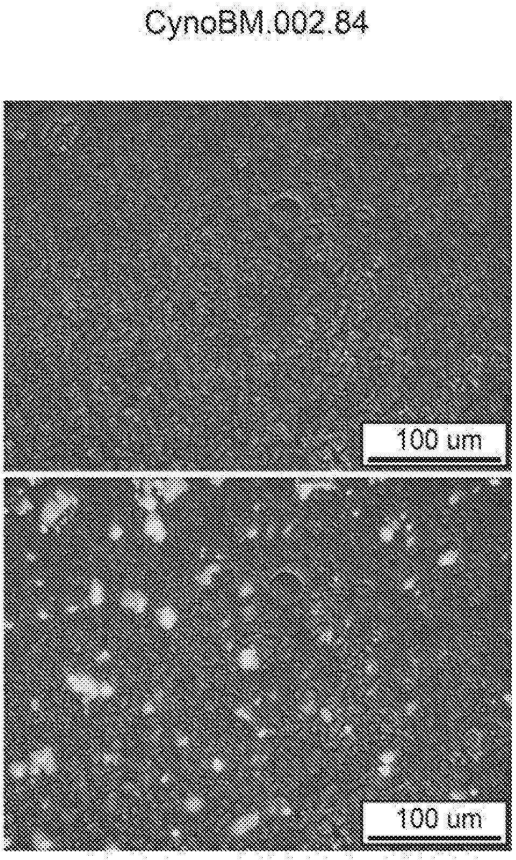
도면77d


R2 - Cyno.002.09 IL2RN E4-6
생존 : 37.180%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002.09 IL2RN E4-6
fHbb+: 1.870%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002.09 IL2RN E4-6
0.660%
7.560%
28.390%
0.570%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002.09 IL2RN E4-6
CD3+: 2.220%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

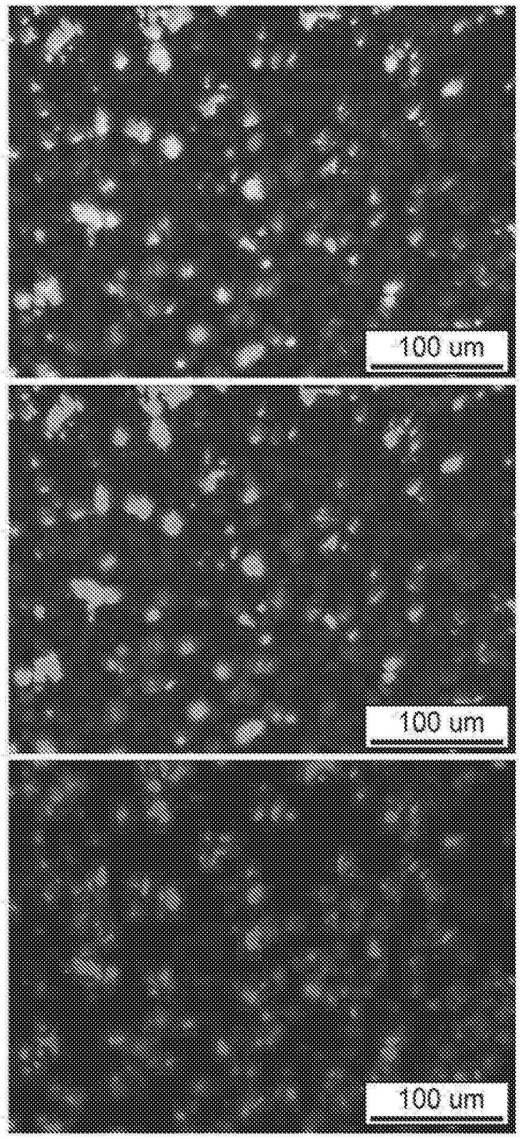
도면77e


생존 - Cyno.002.09 IL2RN E4-6
CD34+: 3.480%
수
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002.09 IL2RN E4-6
CD45+: 7.030%
수
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.09 IL2RN E4-6
생존CD34 Cas9: 3.85...
수
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.09 IL2RN E4-6
생존CD34 mRNA: 3.9...
수
mRNA - CY5-H

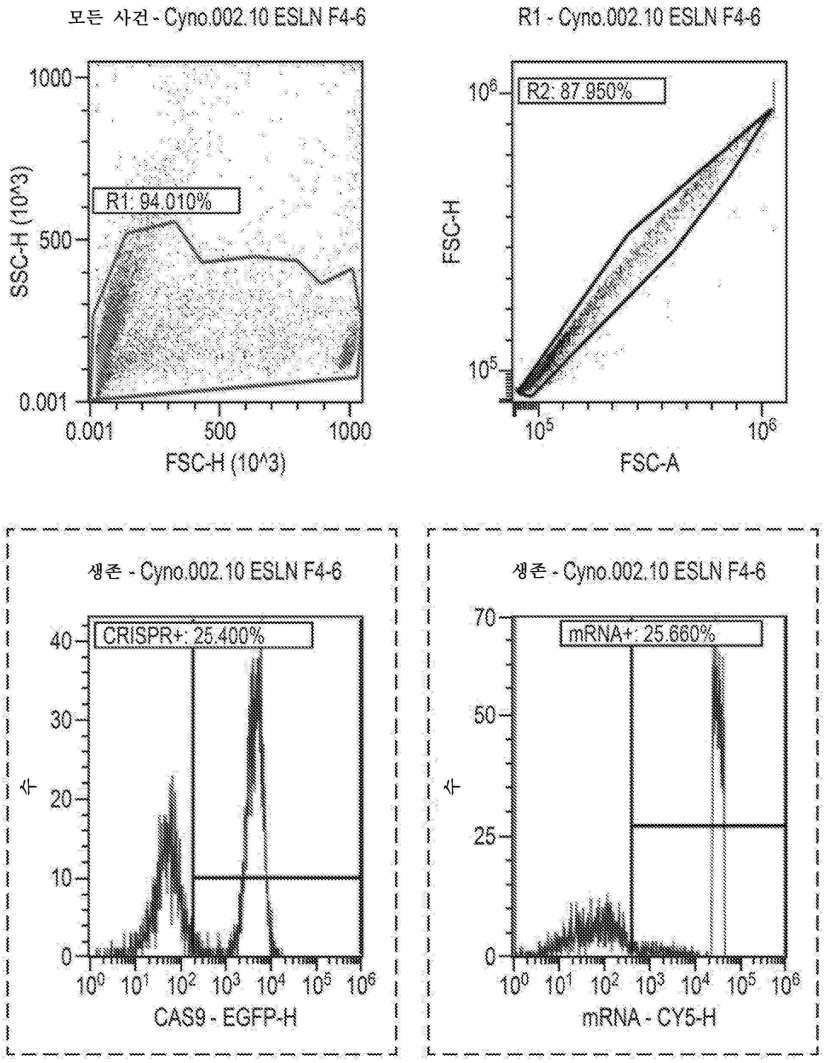
도면78a



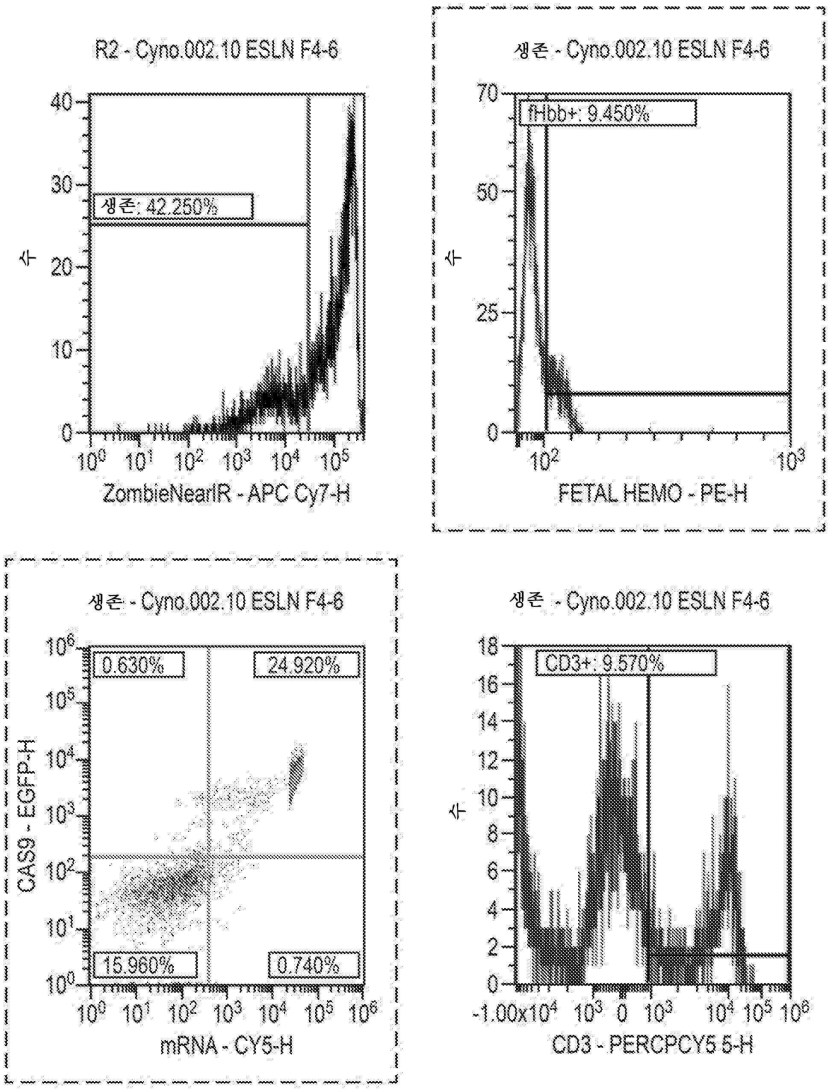
도면78b



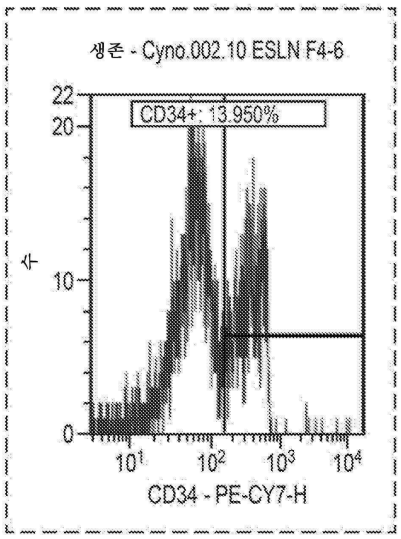
도면78c

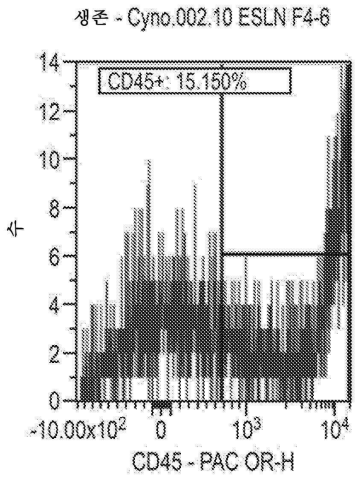

모든 사건 - Cyno.002.10 ESLN F4-6
R1: 94.010%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002.10 ESLN F4-6
R2: 87.950%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002.10 ESLN F4-6
CRISPR+: 25.400%
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002.10 ESLN F4-6
mRNA+: 25.660%
mRNA - CY5-H

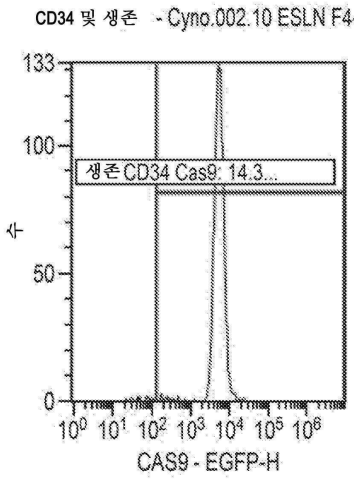
도면78d

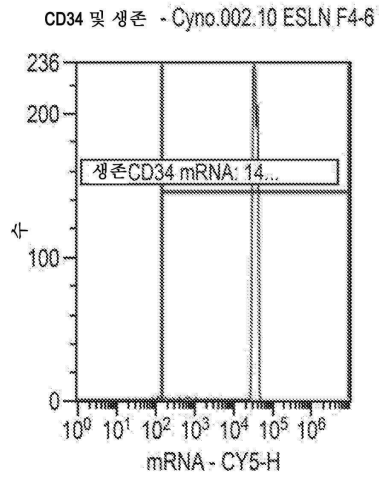

R2 - Cyno.002.10 ESLN F4-6
생존: 42.250%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002.10 ESLN F4-6
fHbb+: 9.450%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002.10 ESLN F4-6
0.630%
24.920%
15.960%
0.740%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002.10 ESLN F4-6
CD3+: 9.570%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

도면78e

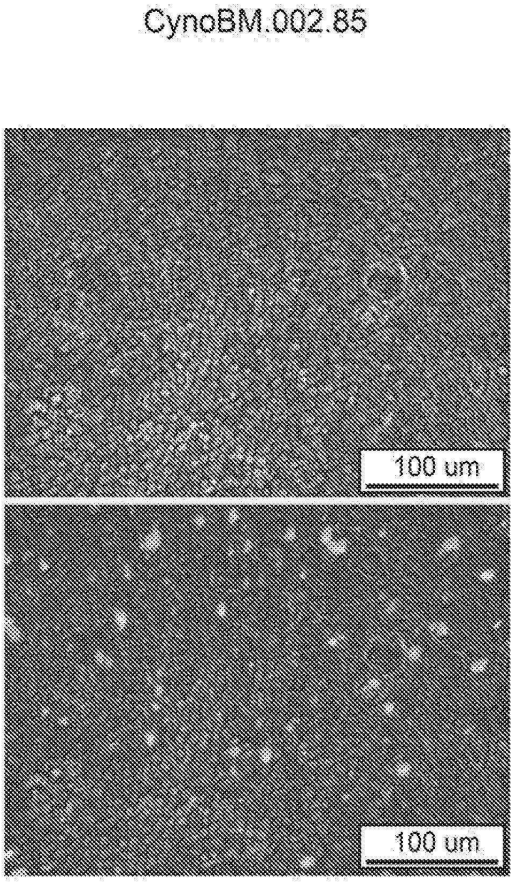

생존 - Cyno.002.10 ESLN F4-6
CD34+: 13.950%
수
CD34 - PE-CY7-H


생존 - Cyno.002.10 ESLN F4-6
CD45+: 15.150%
수
CD45 - PAC OR-H

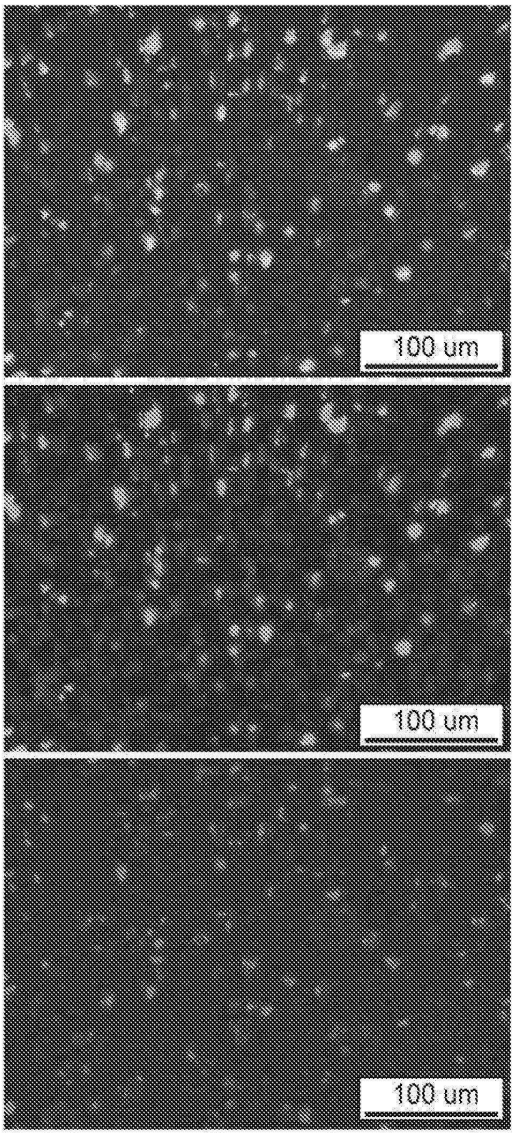

CD34 및 생존 - Cyno.002.10 ESLN F4-6
생존CD34 Cas9: 14.3...
수
CAS9 - EGFP-H


CD34 및 생존 - Cyno.002.10 ESLN F4-6
생존CD34 mRNA: 14...
수
mRNA - CY5-H

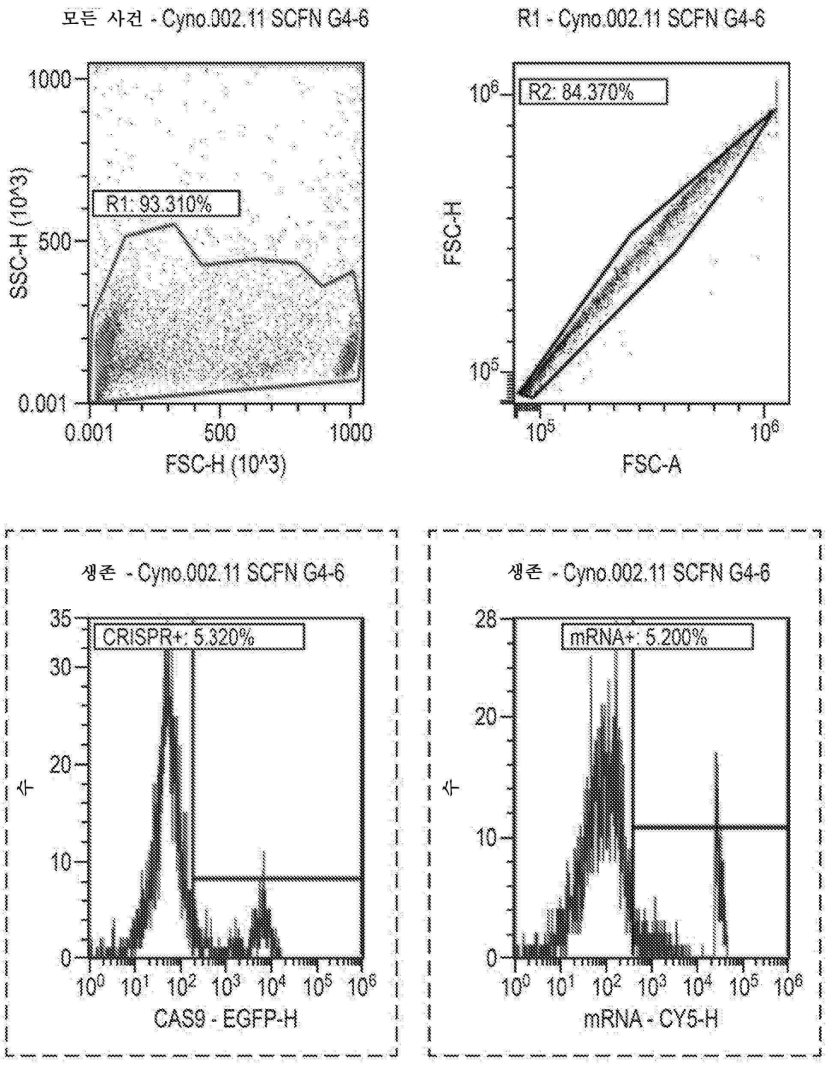
도면79a



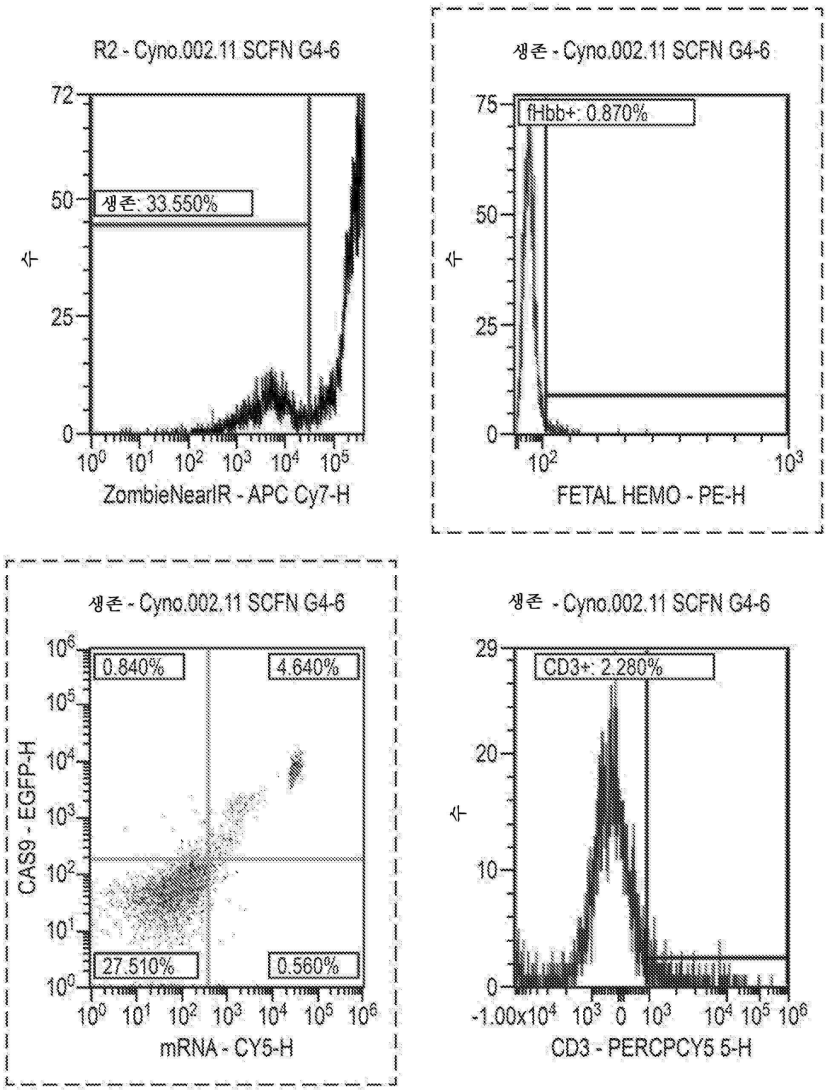
도면79b



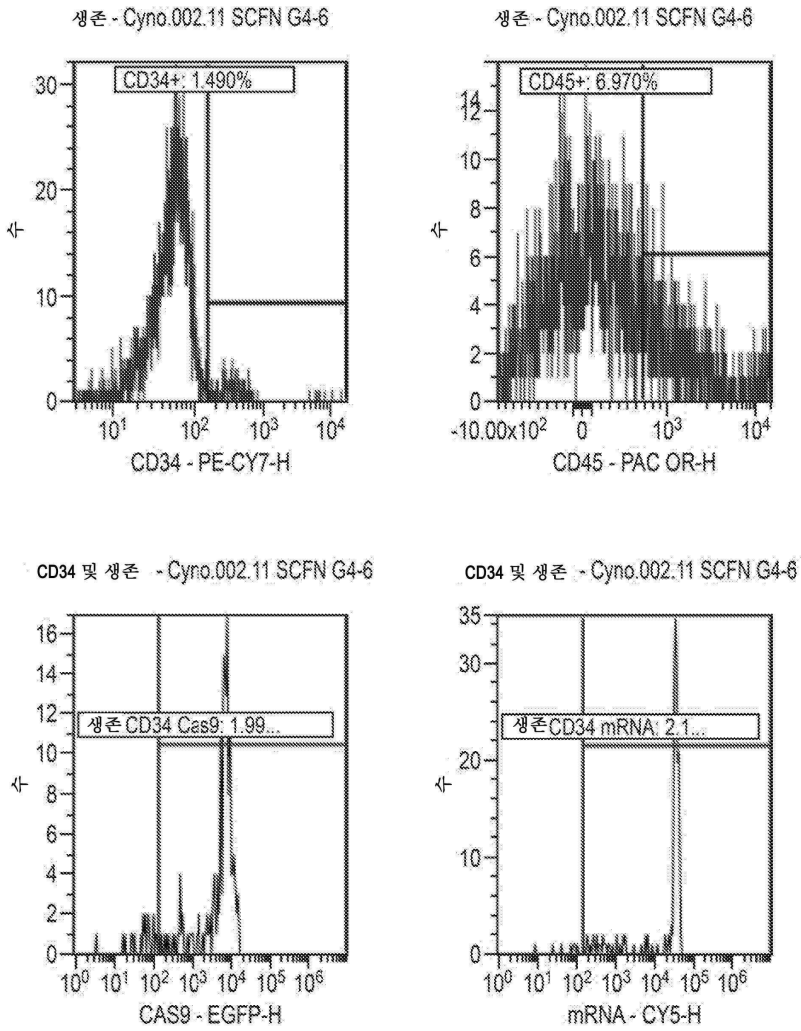
도면79c


모든 사건 - Cyno.002.11 SCFN G4-6
R1: 93.310%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002.11 SCFN G4-6
R2: 84.370%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002.11 SCFN G4-6
CRISPR+: 5.320%
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002.11 SCFN G4-6
mRNA+: 5.200%
수
mRNA - CY5-H

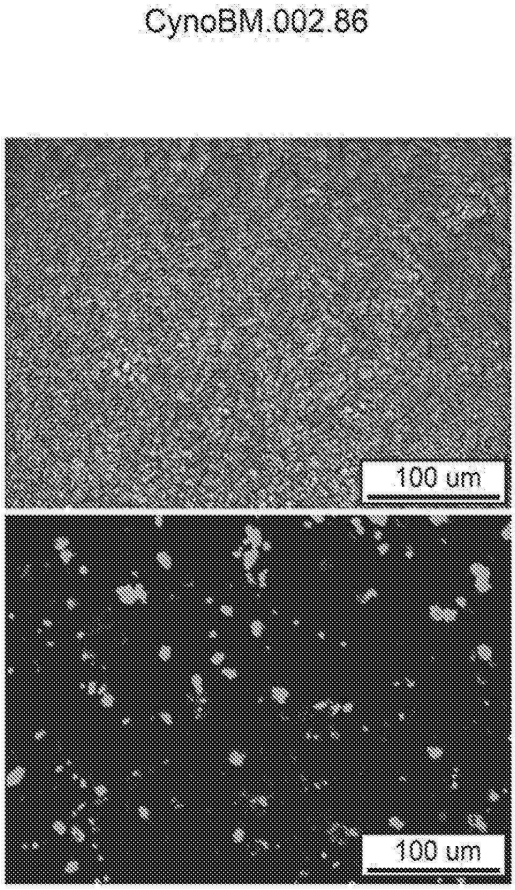
도면79d


R2 - Cyno.002.11 SCFN G4-6
생존: 33.550%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002.11 SCFN G4-6
fHbb+: 0.870%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002.11 SCFN G4-6
0.840%
4.640%
27.510%
0.560%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002.11 SCFN G4-6
CD3+: 2.280%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

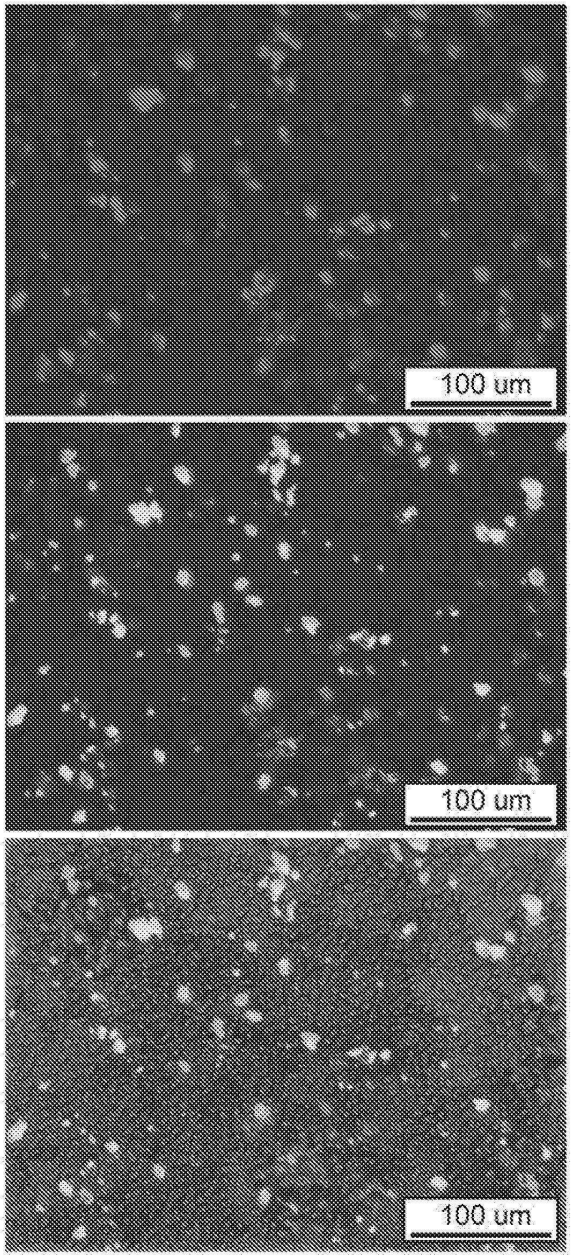
도면79e


생존 - Cyno.002.11 SCFN G4-6
CD34+: 1.490%
수
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002.11 SCFN G4-6
CD45+: 6.970%
수
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.11 SCFN G4-6
생존CD34 Cas9: 1.99...
수
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.11 SCFN G4-6
생존CD34 mRNA: 2.1...
수
mRNA - CY5-H

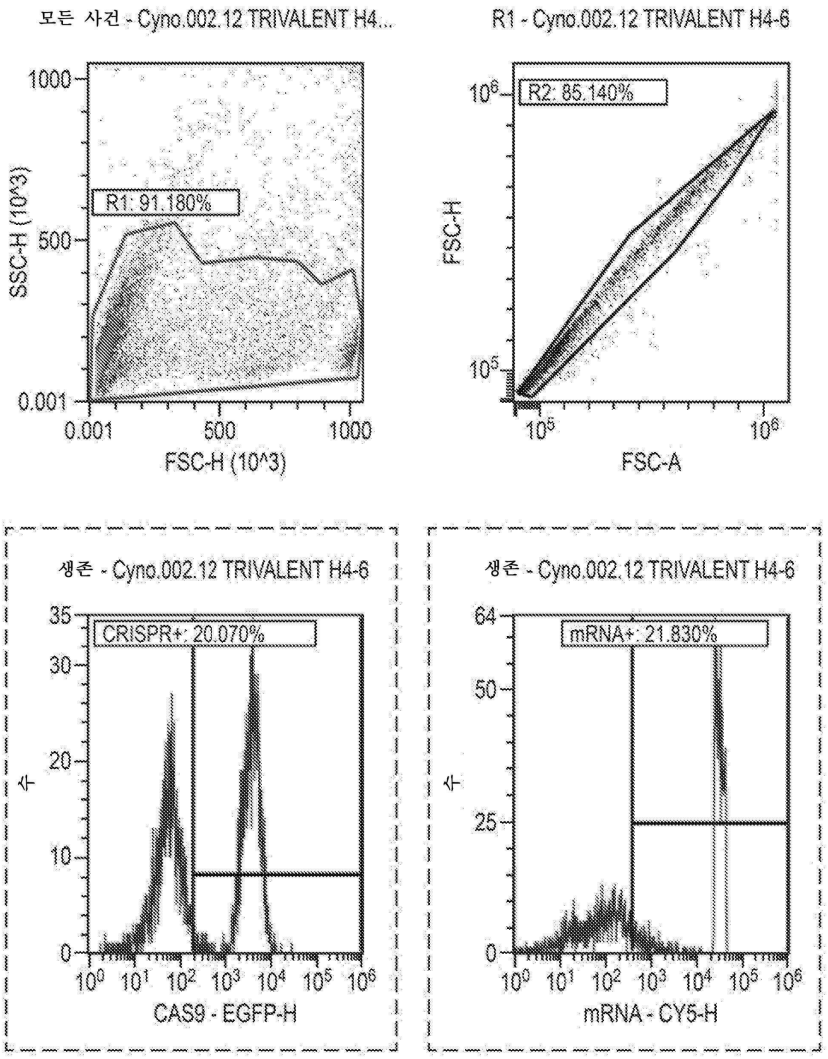
도면80a



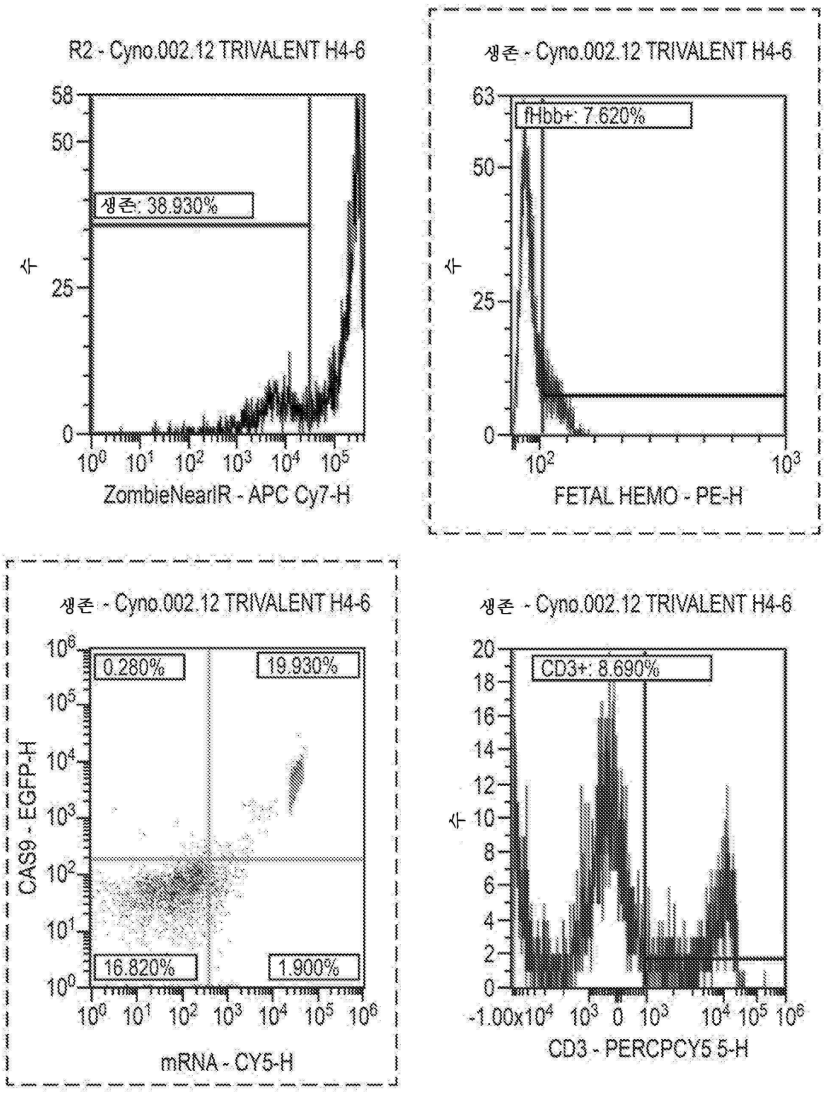
도면80b



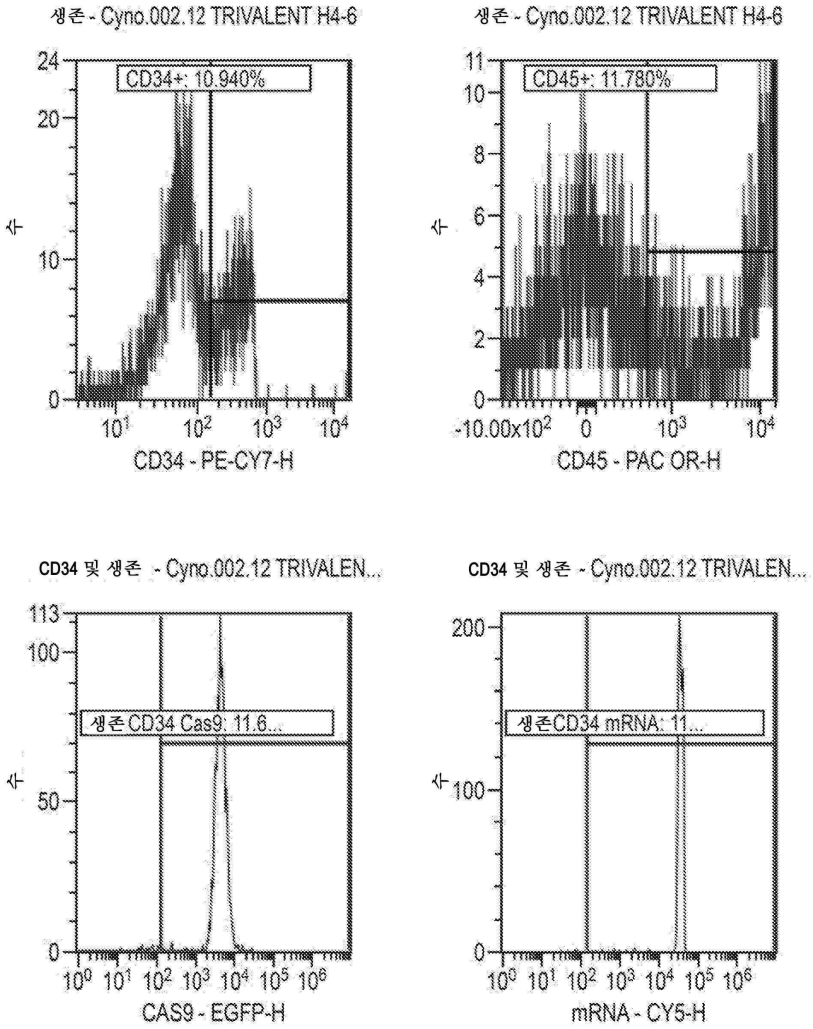
도면80c


모든 사건 - Cyno.002.12 TRIVALENT H4...
R1: 91.180%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002.12 TRIVALENT H4-6
R2: 85.140%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002.12 TRIVALENT H4-6
CRISPR+: 20.070%
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002.12 TRIVALENT H4-6
mRNA+: 21.830%
수
mRNA - CY5-H

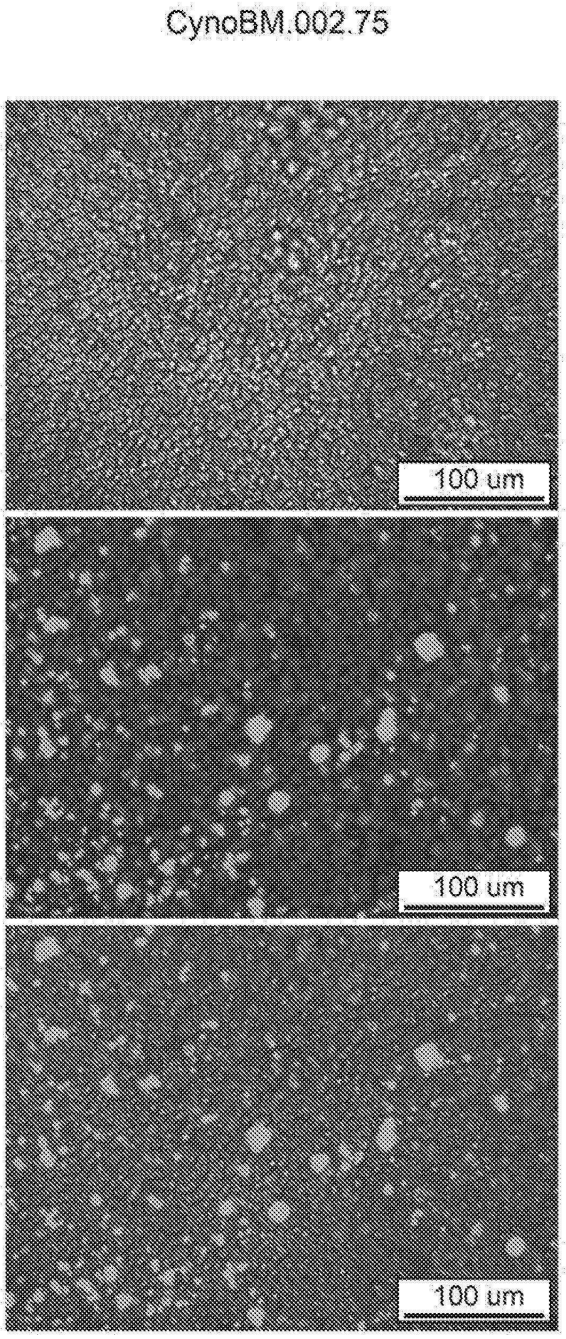
도면80d


R2 - Cyno.002.12 TRIVALENT H4-6
생존: 38.930%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002.12 TRIVALENT H4-6
fHbb+: 7.620%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002.12 TRIVALENT H4-6
0.280%
19.930%
16.820%
1.900%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002.12 TRIVALENT H4-6
CD3+: 8.690%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

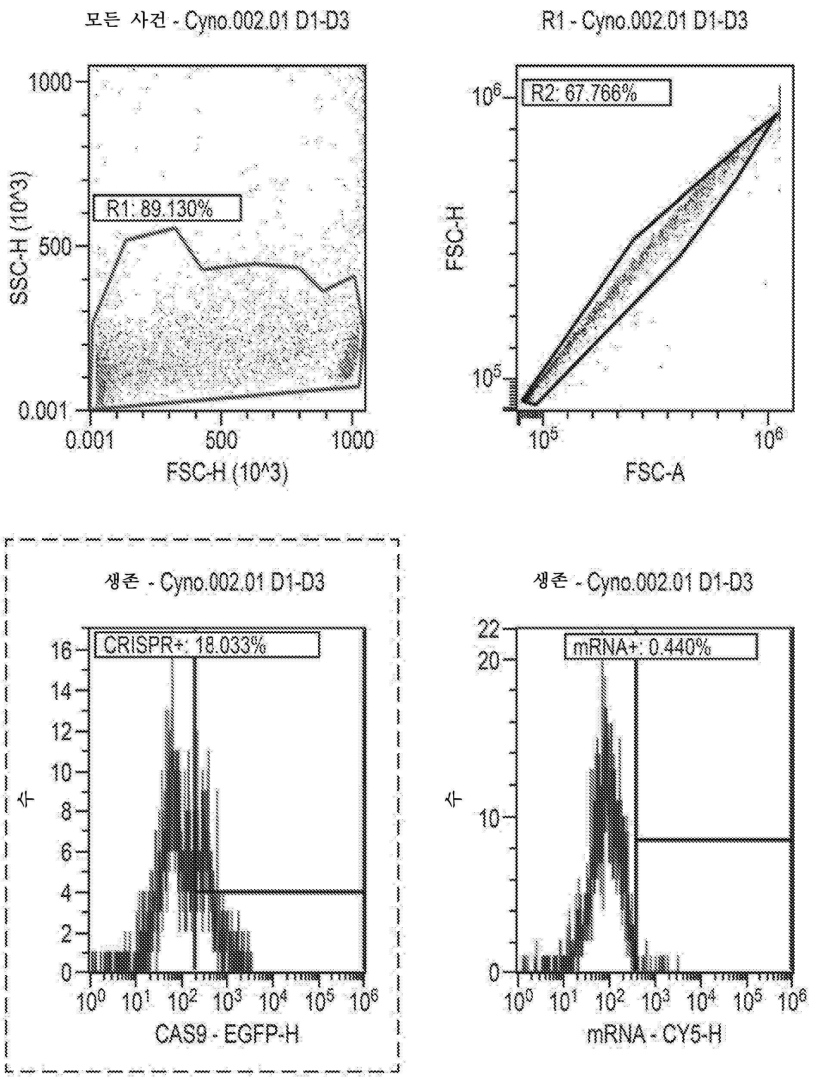
도면80e


생존 - Cyno.002.12 TRIVALENT H4-6
CD34+: 10.940%
수
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002.12 TRIVALENT H4-6
CD45+: 11.780%
수
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.12 TRIVALEN...
생존CD34 Cas9: 11.6...
수
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.12 TRIVALEN...
생존CD34 mRNA: 11...
수
mRNA - CY5-H

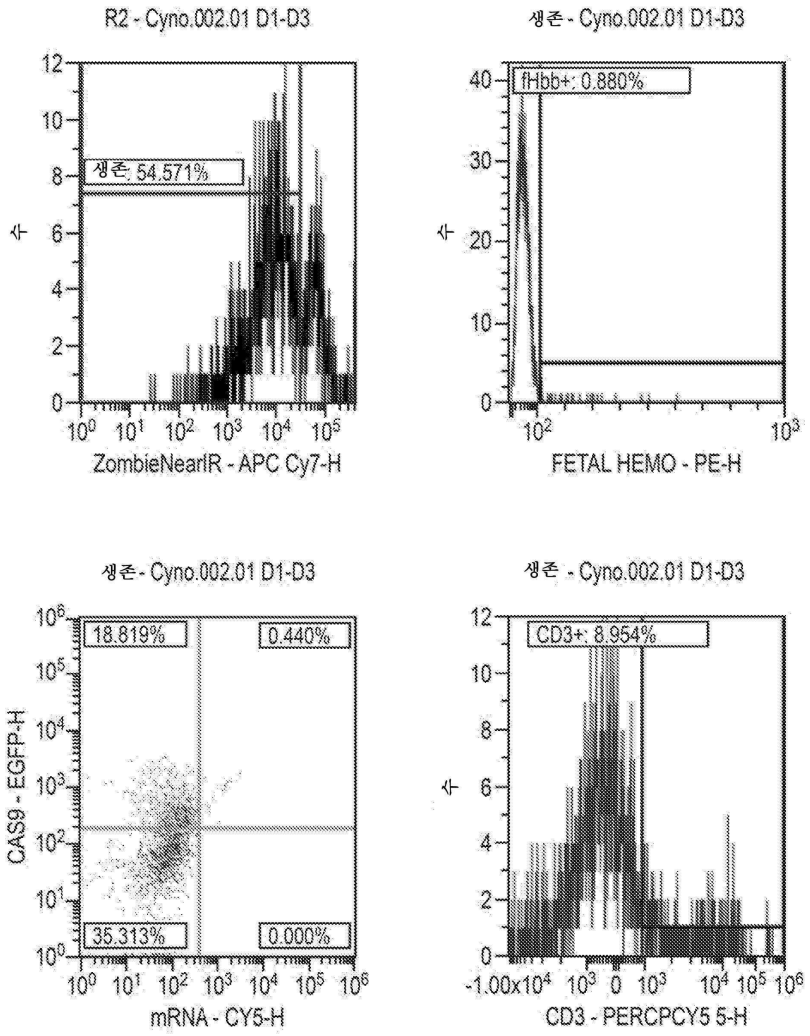
도면81a



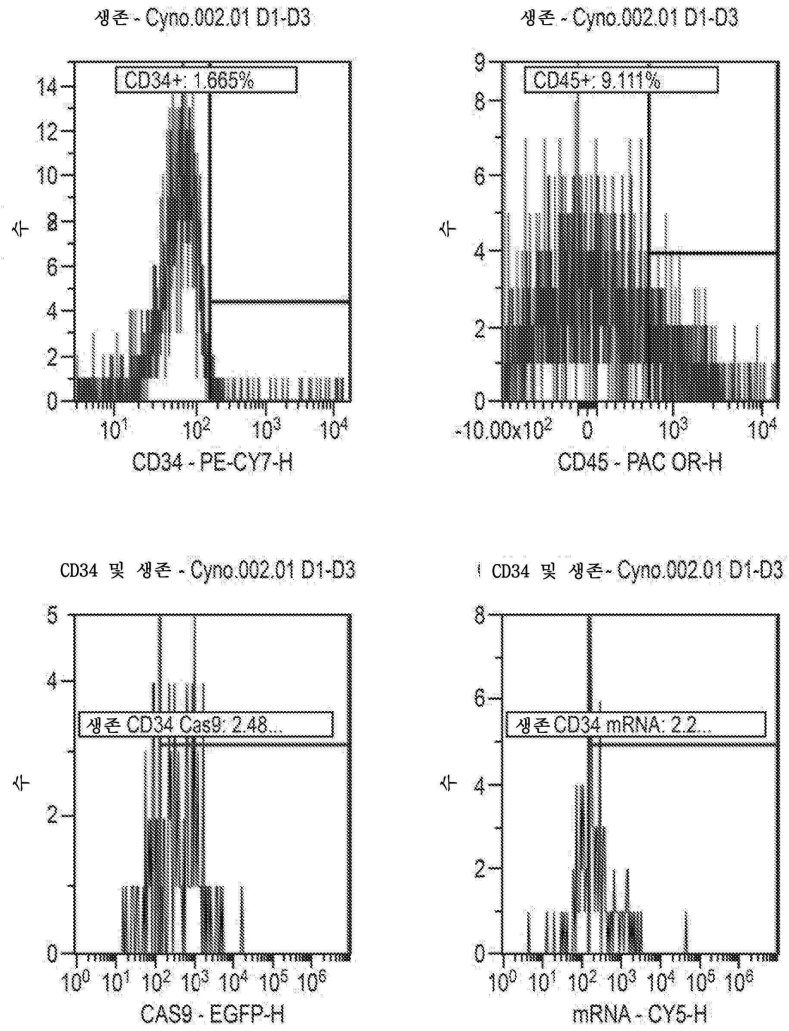
도면81b


모든 사건 - Cyno.002.01 D1-D3
R1: 89.130%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002.01 D1-D3
R2: 67.766%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002.01 D1-D3
CRISPR+: 18.033%
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002.01 D1-D3
mRNA+: 0.440%
수
mRNA - CY5-H

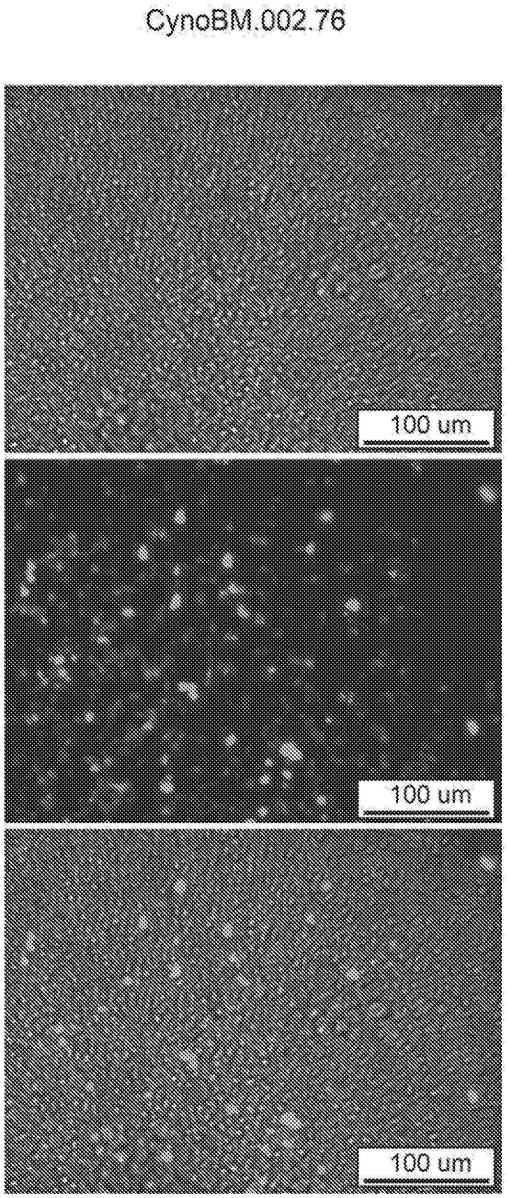
도면81c


R2 - Cyno.002.01 D1-D3
생존: 54.571%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002.01 D1-D3
fHbb+: 0.880%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002.01 D1-D3
18.819%
0.440%
35.313%
0.000%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002.01 D1-D3
CD3+: 8.954%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

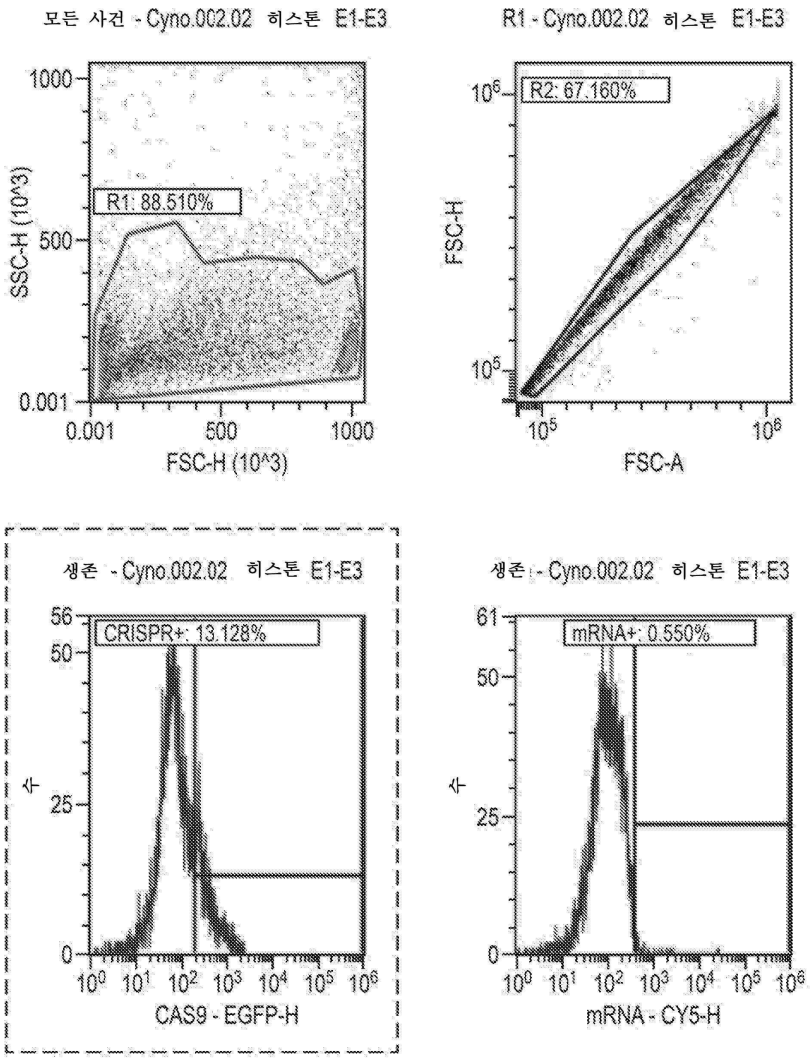
도면81d


생존 - Cyno.002.01 D1-D3
CD34+: 1.665%
수
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002.01 D1-D3
CD45+: 9.111%
수
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.01 D1-D3
생존 CD34 Cas9: 2.48...
수
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.01 D1-D3
생존 CD34 mRNA: 2.2...
수
mRNA - CY5-H

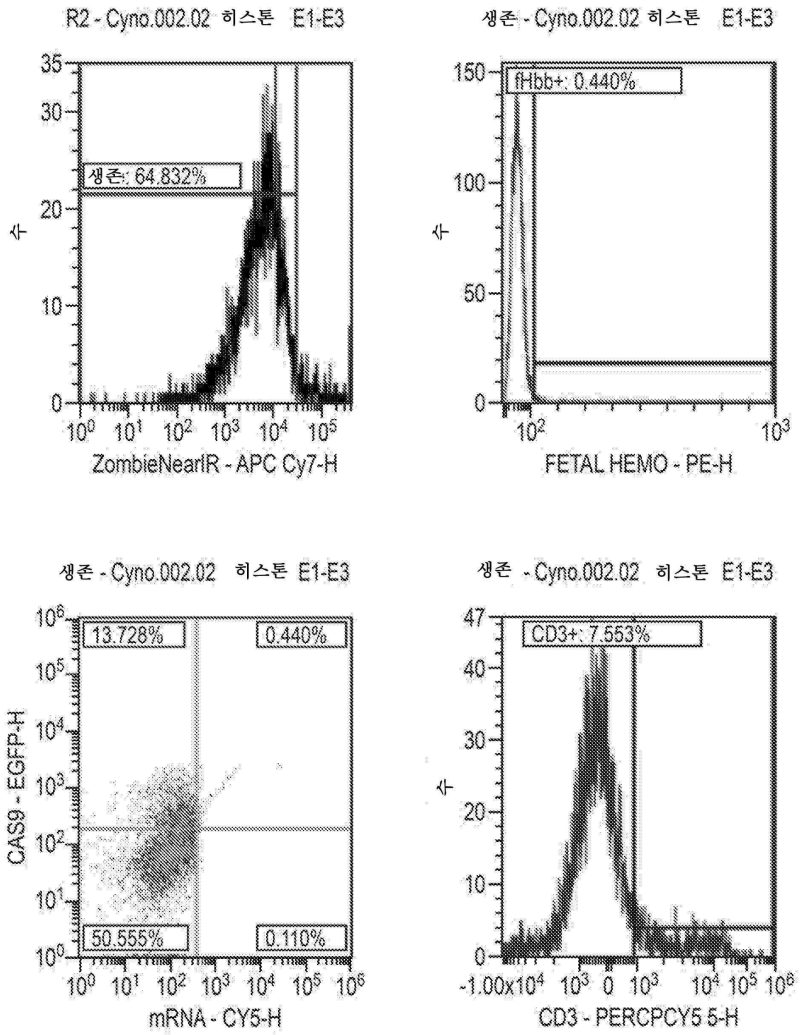
도면82a



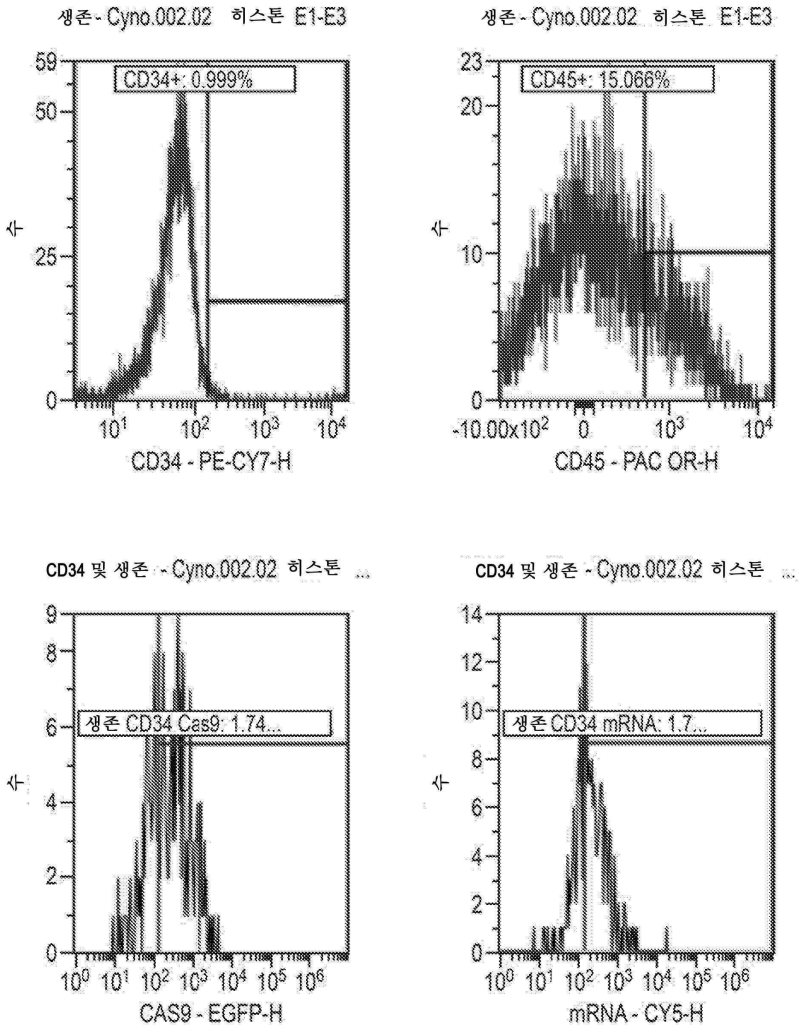
도면82b


모든 사건 - Cyno.002.02 히스톤 E1-E3
R1: 88.510%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002.02 히스톤 E1-E3
R2: 67.160%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002.02 히스톤 E1-E3
CRISPR+: 13.128%
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002.02 히스톤 E1-E3
mRNA+: 0.550%
수
mRNA - CY5-H

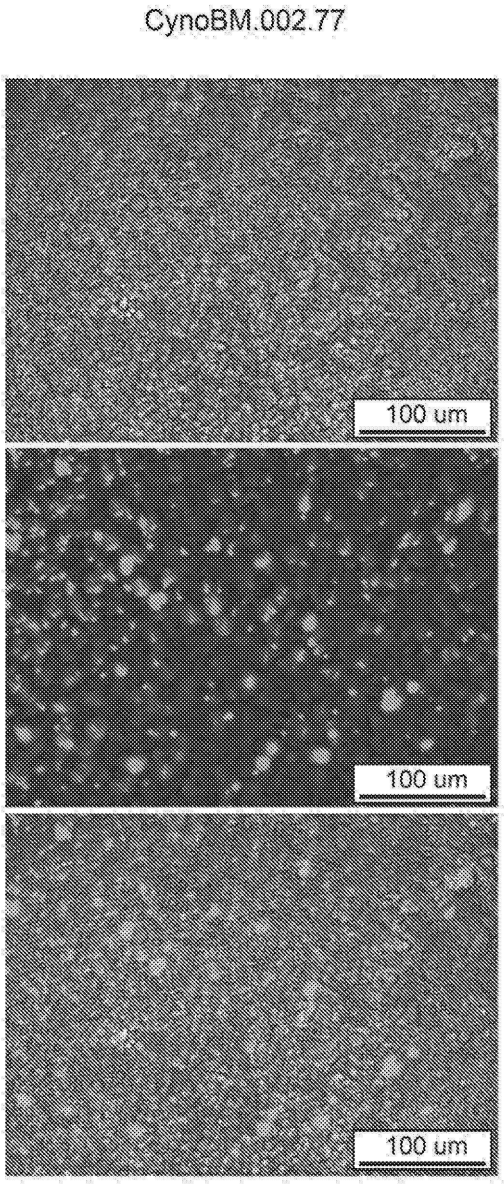
도면82c


R2 - Cyno.002.02 히스톤 E1-E3
생존: 64.832%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002.02 히스톤 E1-E3
fHbb+: 0.440%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002.02 히스톤 E1-E3
13.728%
0.440%
50.555%
0.110%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002.02 히스톤 E1-E3
CD3+: 7.553%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

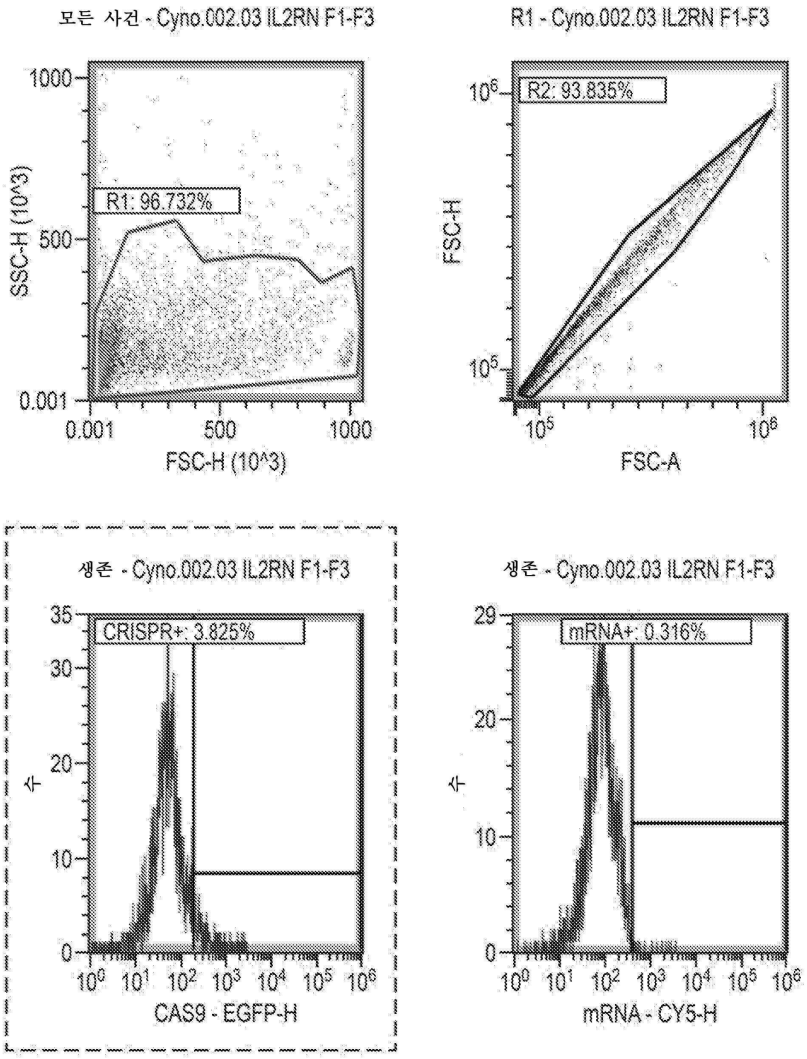
도면82d


생존 - Cyno.002.02 히스톤 E1-E3
CD34+: 0.999%
수
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002.02 히스톤 E1-E3
CD45+: 15.066%
수
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.02 히스톤 ...
생존 CD34 Cas9: 1.74...
수
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.02 히스톤 ...
생존 CD34 mRNA: 1.7...
수
mRNA - CY5-H

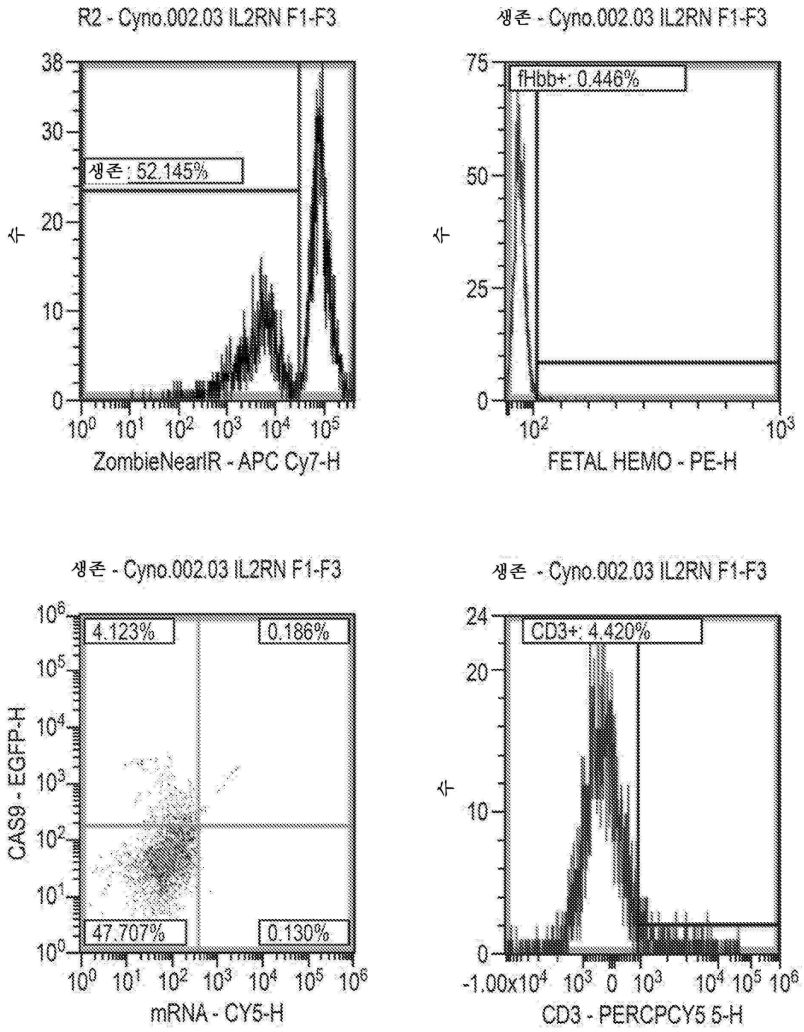
도면83a



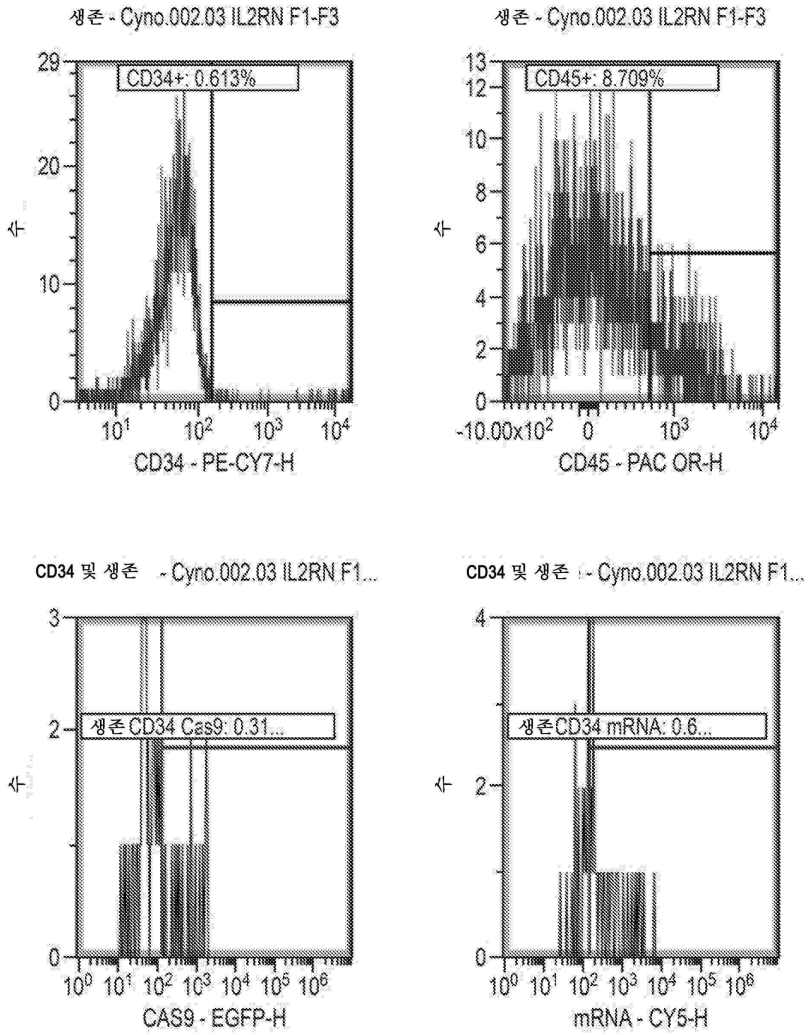
도면83b


모든 사건 - Cyno.002.03 IL2RN F1-F3
R1: 96.732%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002.03 IL2RN F1-F3
R2: 93.835%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002.03 IL2RN F1-F3
CRISPR+: 3.825%
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002.03 IL2RN F1-F3
mRNA+: 0.316%
수
mRNA - CY5-H

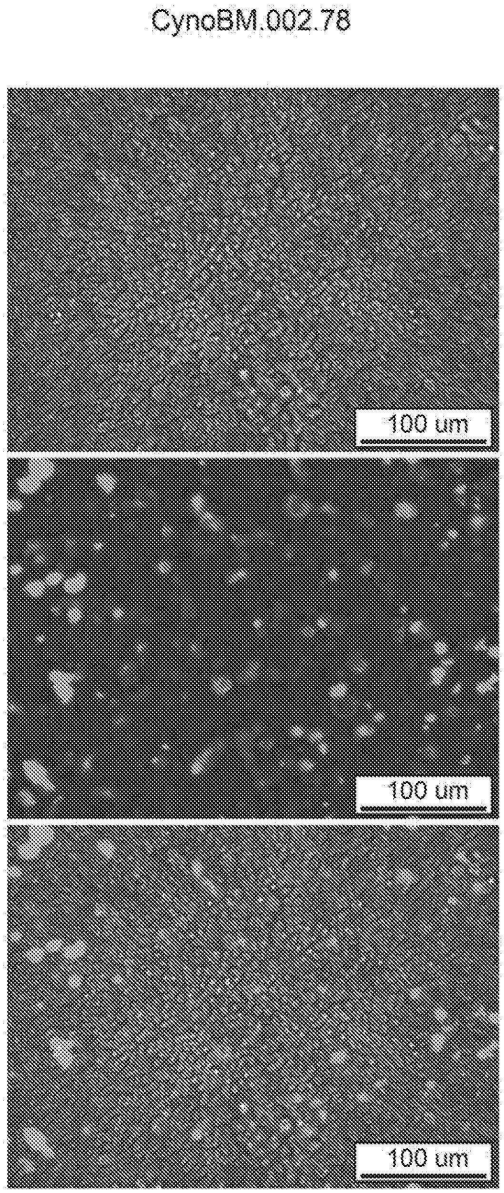
도면83c


R2 - Cyno.002.03 IL2RN F1-F3
생존 : 52.145%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002.03 IL2RN F1-F3
fHbb+: 0.446%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002.03 IL2RN F1-F3
4.123%
0.186%
47.707%
0.130%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002.03 IL2RN F1-F3
CD3+: 4.420%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

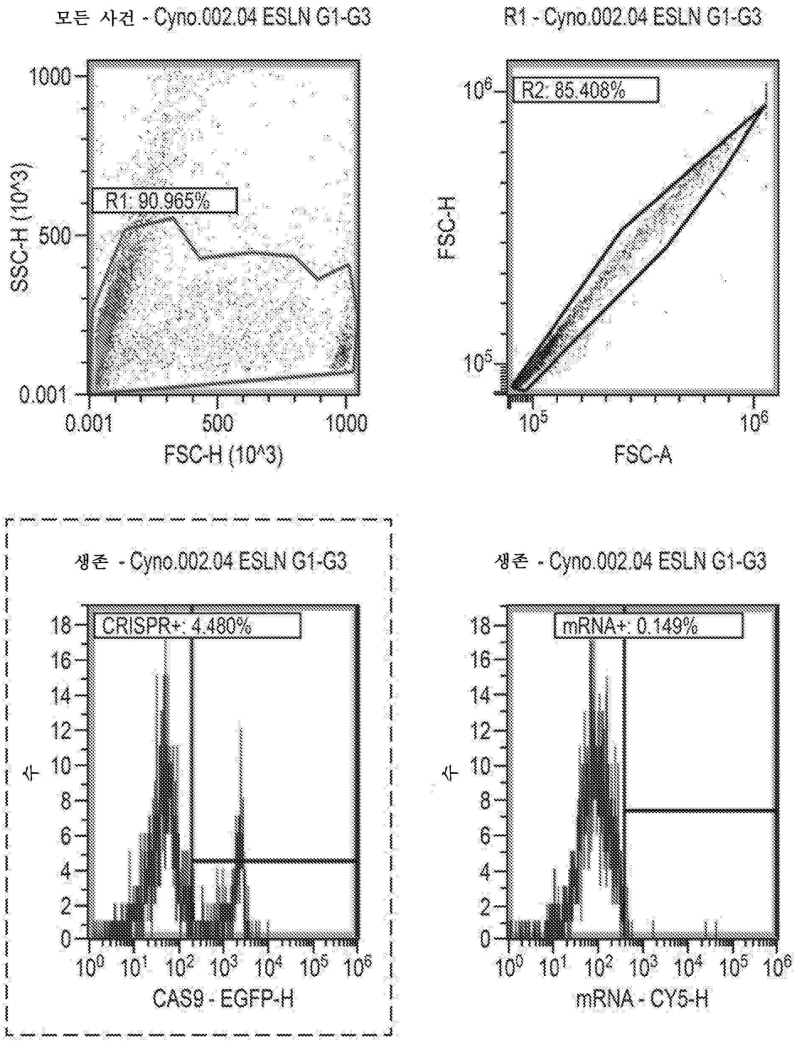
도면83d


생존 - Cyno.002.03 IL2RN F1-F3
CD34+: 0.613%
수
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002.03 IL2RN F1-F3
CD45+: 8.709%
수
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.03 IL2RN F1...
생존CD34 Cas9: 0.31...
수
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.03 IL2RN F1...
생존CD34 mRNA: 0.6...
수
mRNA - CY5-H

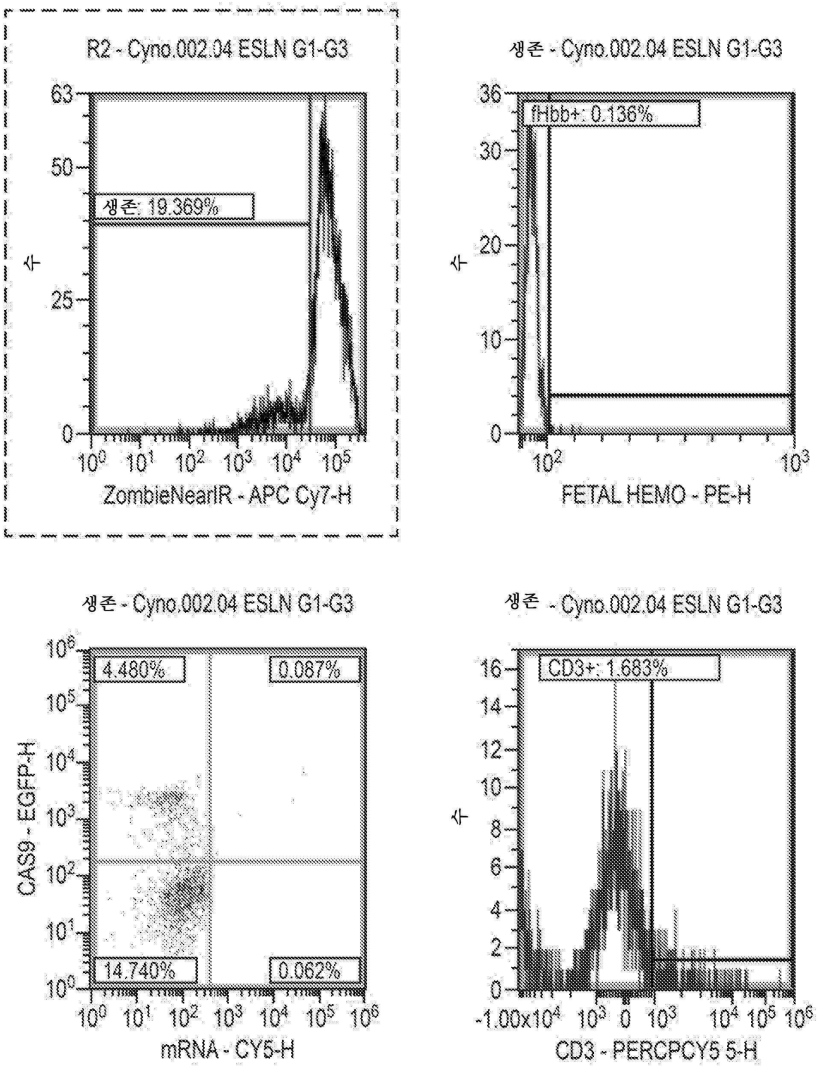
도면84a



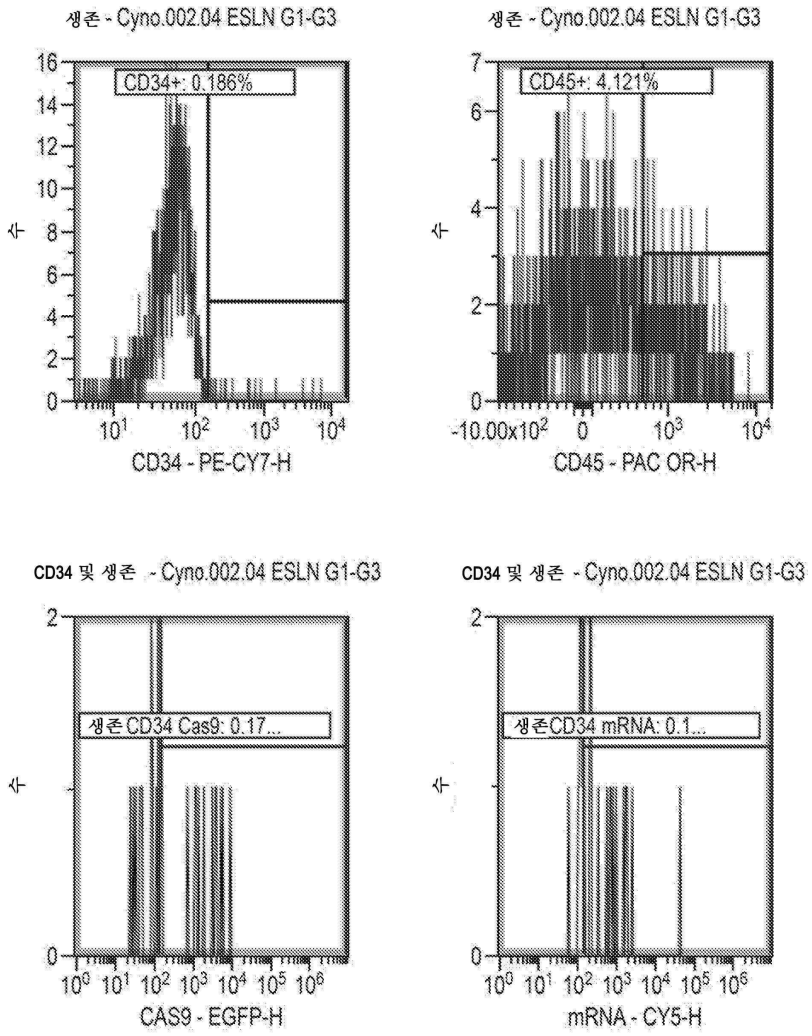
도면84b


모든 사건 - Cyno.002.04 ESLN G1-G3
R1: 90.965%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002.04 ESLN G1-G3
R2: 85.408%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002.04 ESLN G1-G3
CRISPR+: 4.480%
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002.04 ESLN G1-G3
mRNA+: 0.149%
수
mRNA - CY5-H

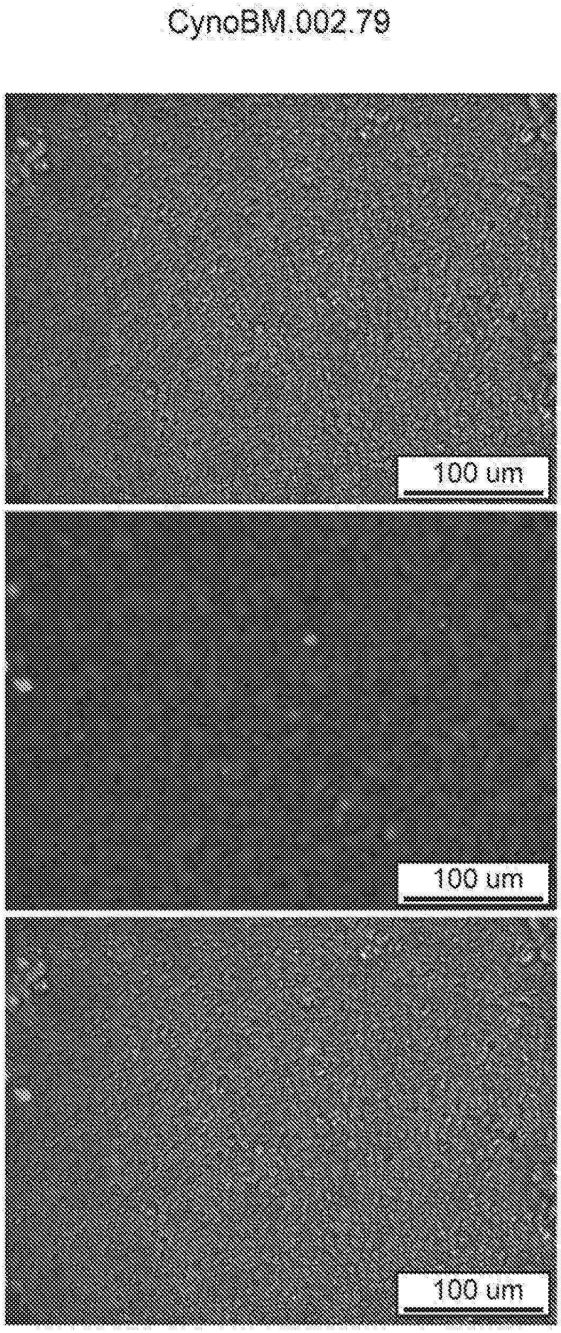
도면84c


R2 - Cyno.002.04 ESLN G1-G3
생존: 19.369%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002.04 ESLN G1-G3
fHbb+: 0.136%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002.04 ESLN G1-G3
4.480%
0.087%
14.740%
0.062%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002.04 ESLN G1-G3
CD3+: 1.683%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

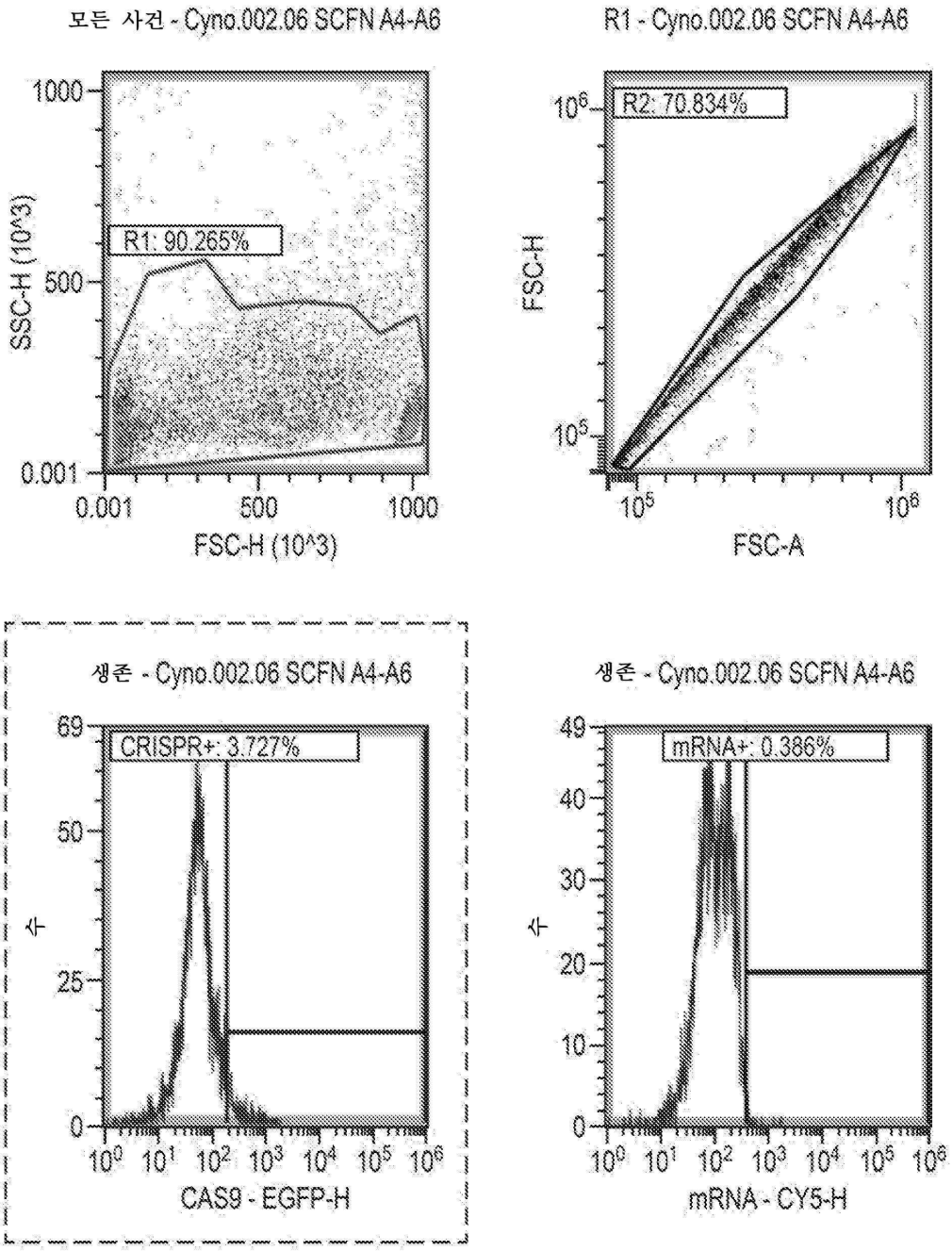
도면84d


생존 - Cyno.002.04 ESLN G1-G3
CD34+: 0.186%
수
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002.04 ESLN G1-G3
CD45+: 4.121%
수
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.04 ESLN G1-G3
생존CD34 Cas9: 0.17...
수
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.04 ESLN G1-G3
생존CD34 mRNA: 0.1...
수
mRNA - CY5-H

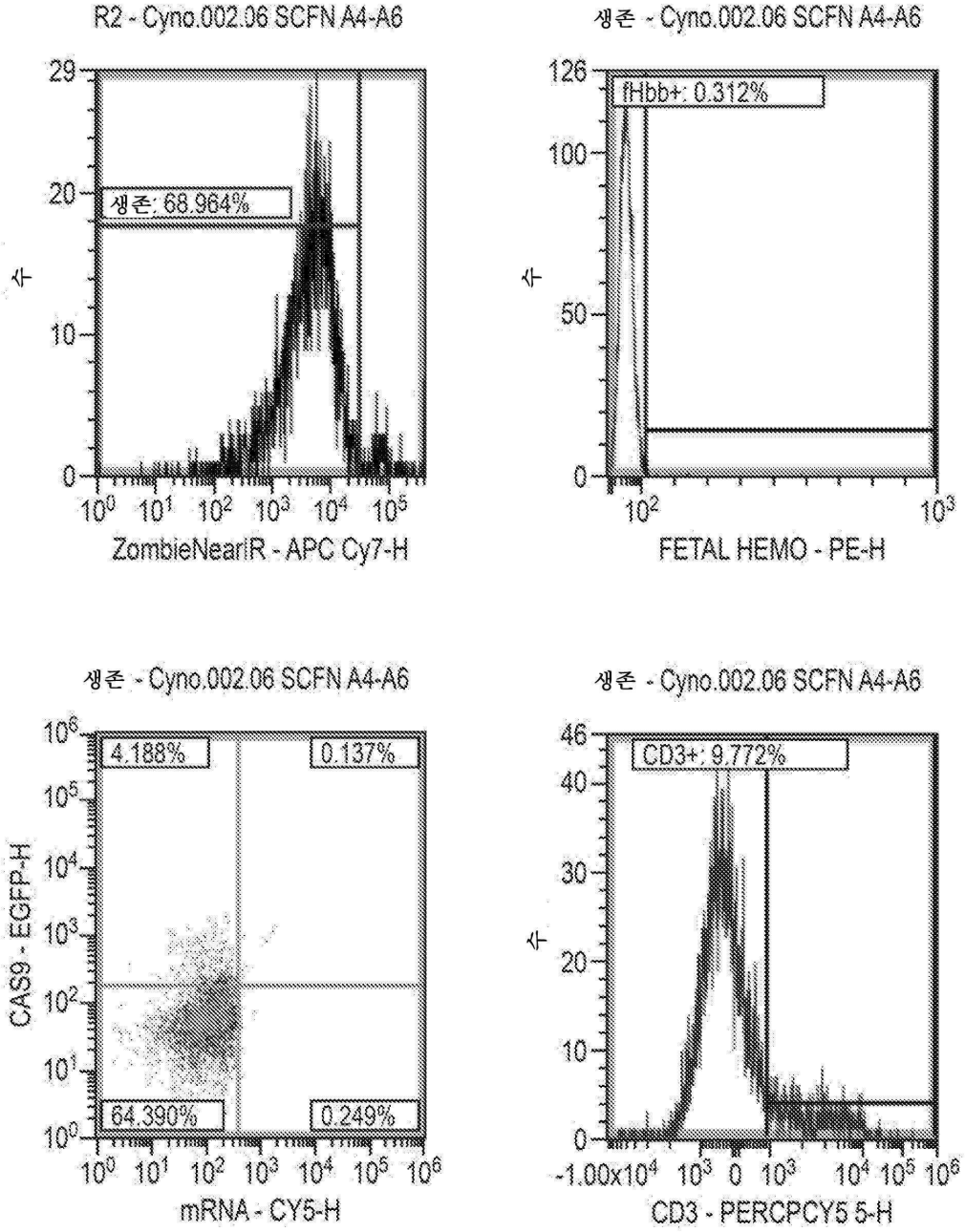
도면85a



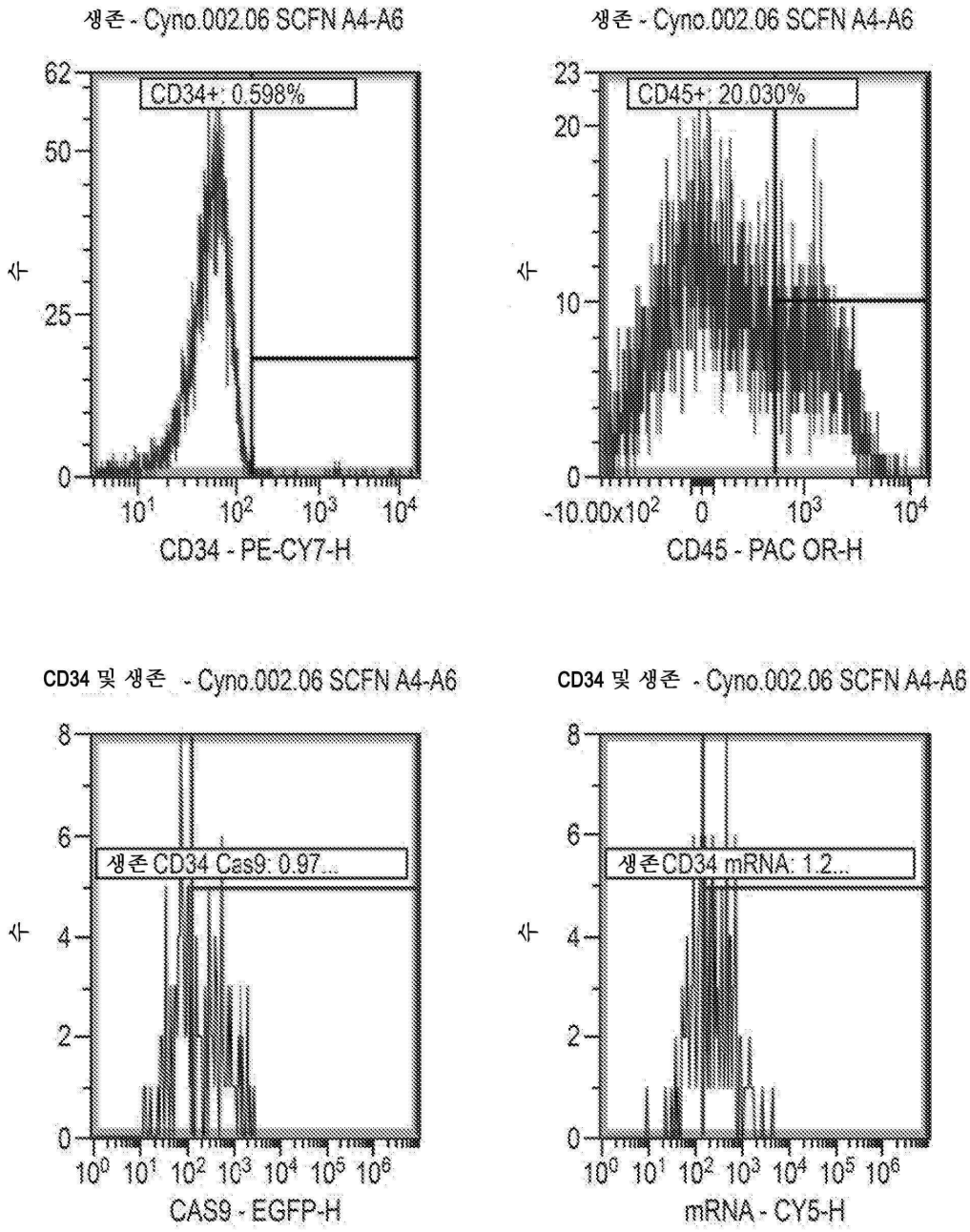
도면85b


모든 사건 - Cyno.002.06 SCFN A4-A6
R1: 90.265%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002.06 SCFN A4-A6
R2: 70.834%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002.06 SCFN A4-A6
CRISPR+: 3.727%
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002.06 SCFN A4-A6
mRNA+: 0.386%
수
mRNA - CY5-H

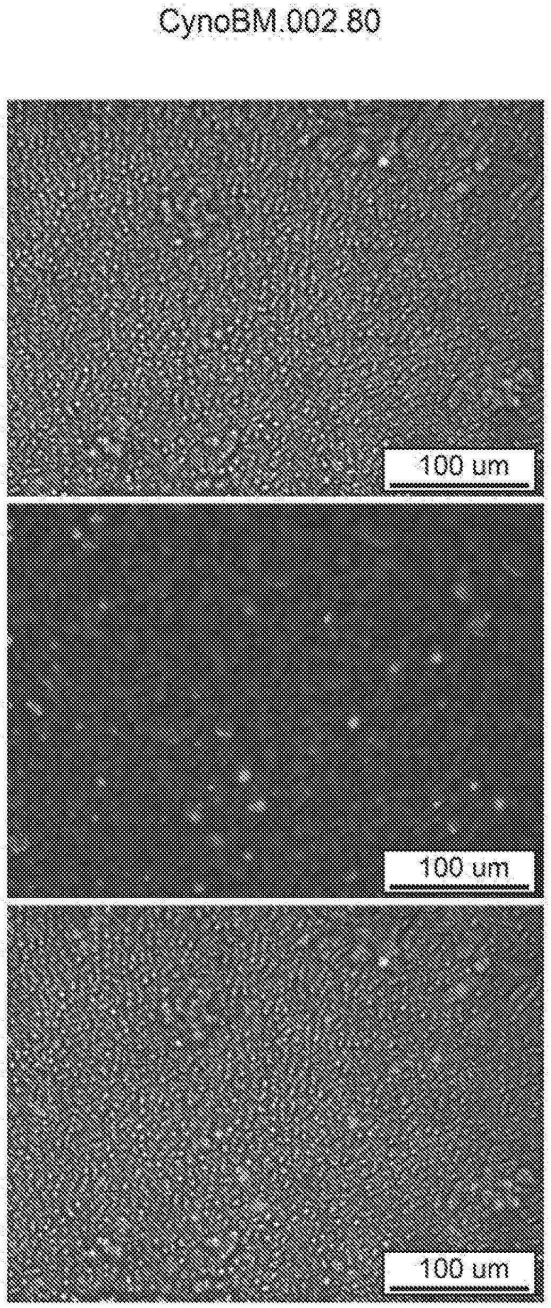
도면85c


R2 - Cyno.002.06 SCFN A4-A6
생존; 68.964%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002.06 SCFN A4-A6
fHbb+: 0.312%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002.06 SCFN A4-A6
4.188%
0.137%
64.390%
0.249%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002.06 SCFN A4-A6
CD3+: 9.772%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

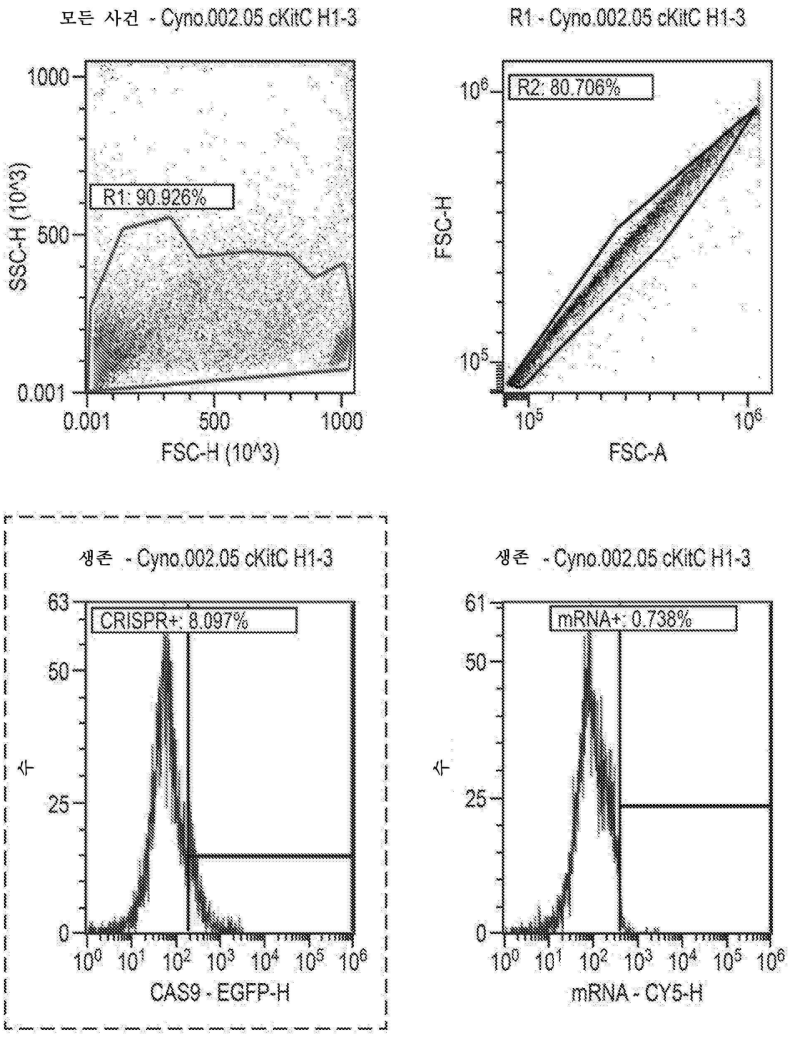
도면85d


생존 - Cyno.002.06 SCFN A4-A6
CD34+: 0.598%
62
50
25
0
수
10^1 10^2 10^3 10^4
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002.06 SCFN A4-A6
CD45+: 20.030%
23
20
10
0
수
-10.00x10^2 0 10^3 10^4
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.06 SCFN A4-A6
생존 CD34 Cas9: 0.97...
8
6
4
2
0
수
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.06 SCFN A4-A6
생존 CD34 mRNA: 1.2...
8
6
4
2
0
수
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
mRNA - CY5-H

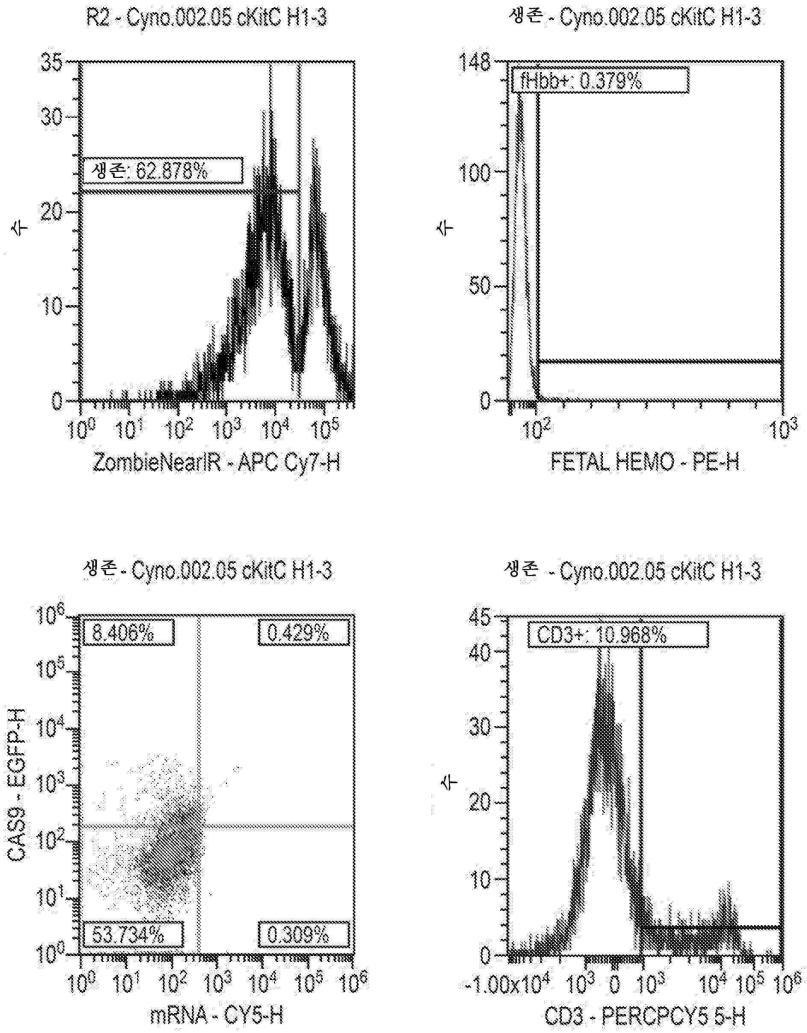
도면86a



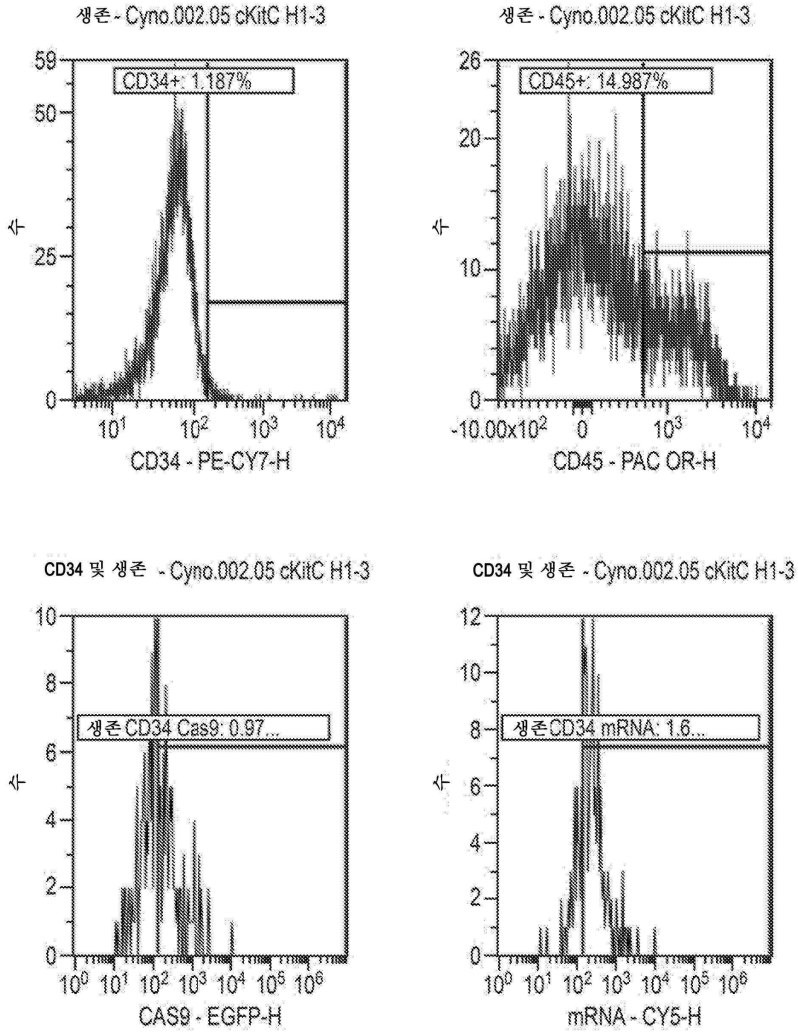
도면86b


모든 사건 - Cyno.002.05 cKitC H1-3
R1: 90.926%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002.05 cKitC H1-3
R2: 80.706%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002.05 cKitC H1-3
CRISPR+: 8.097%
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002.05 cKitC H1-3
mRNA+: 0.738%
수
mRNA - CY5-H

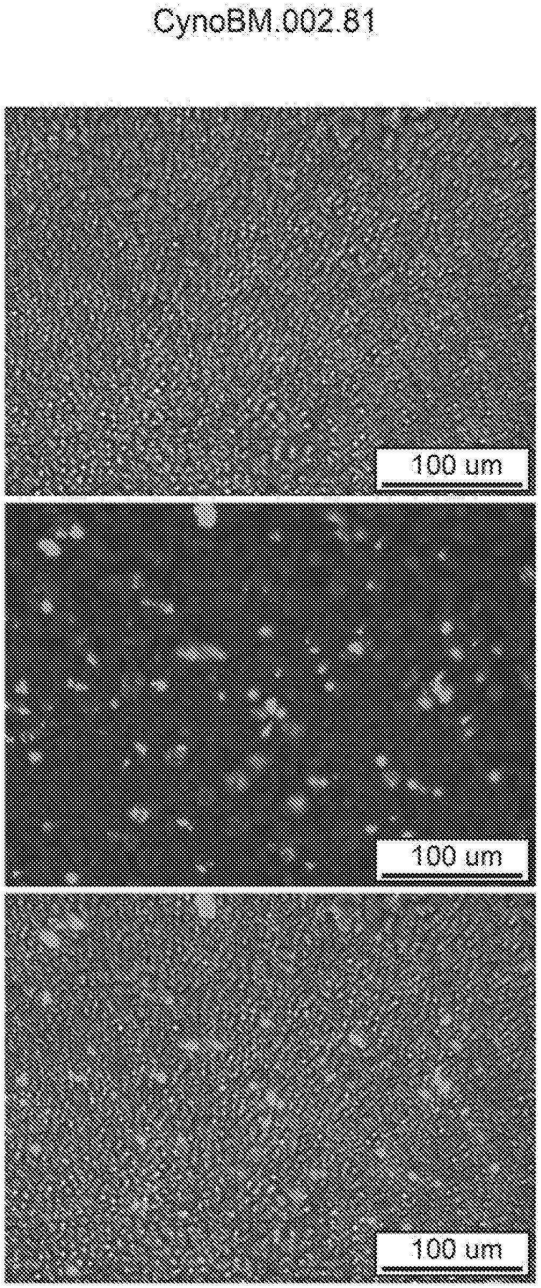
도면86c


R2 - Cyno.002.05 cKitC H1-3
생존: 62.878%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002.05 cKitC H1-3
fHbb+: 0.379%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002.05 cKitC H1-3
8.406%
0.429%
53.734%
0.309%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002.05 cKitC H1-3
CD3+: 10.968%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

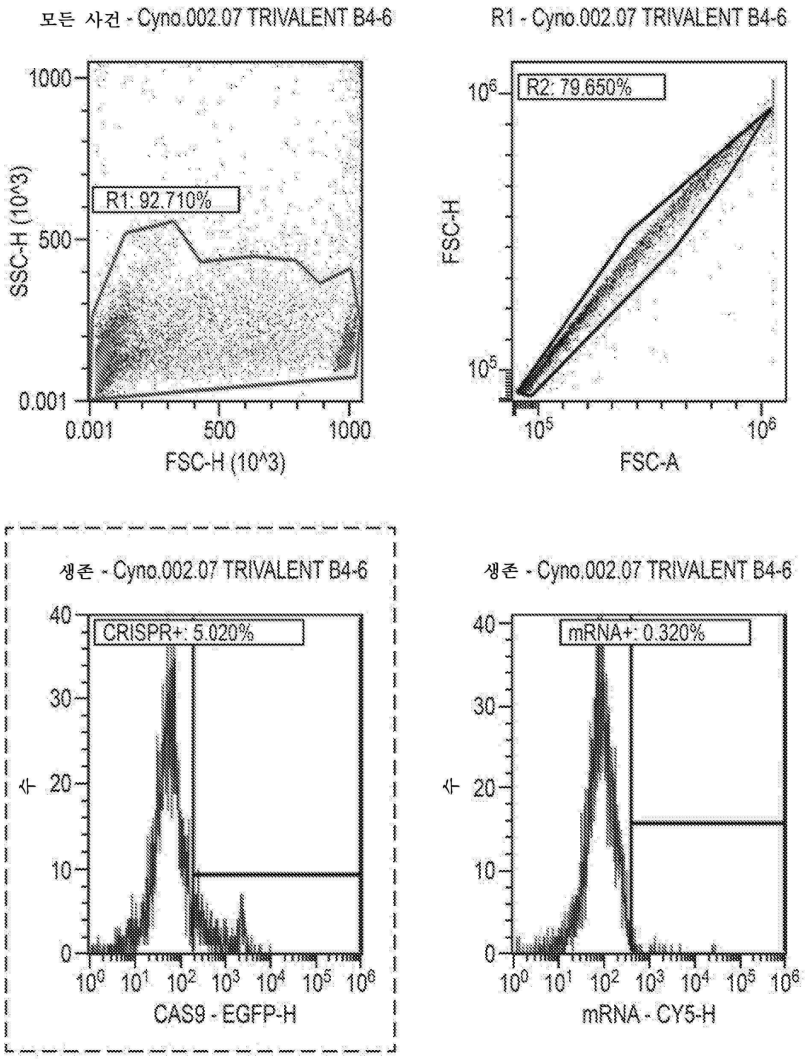
도면86d


생존 - Cyno.002.05 cKitC H1-3
CD34+: 1.187%
수
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002.05 cKitC H1-3
CD45+: 14.987%
수
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.05 cKitC H1-3
생존CD34 Cas9: 0.97...
수
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.05 cKitC H1-3
생존CD34 mRNA: 1.6...
수
mRNA - CY5-H

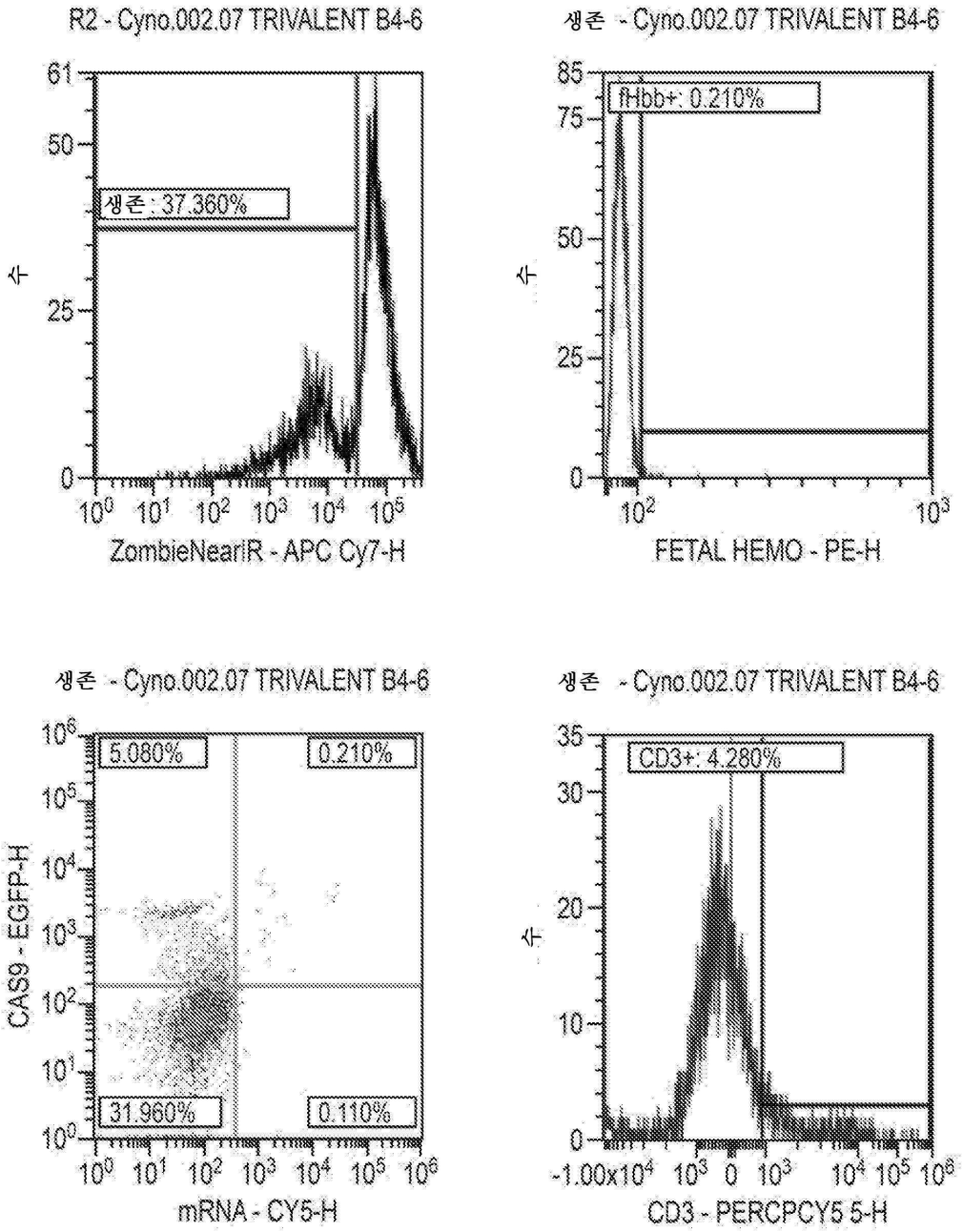
도면87a



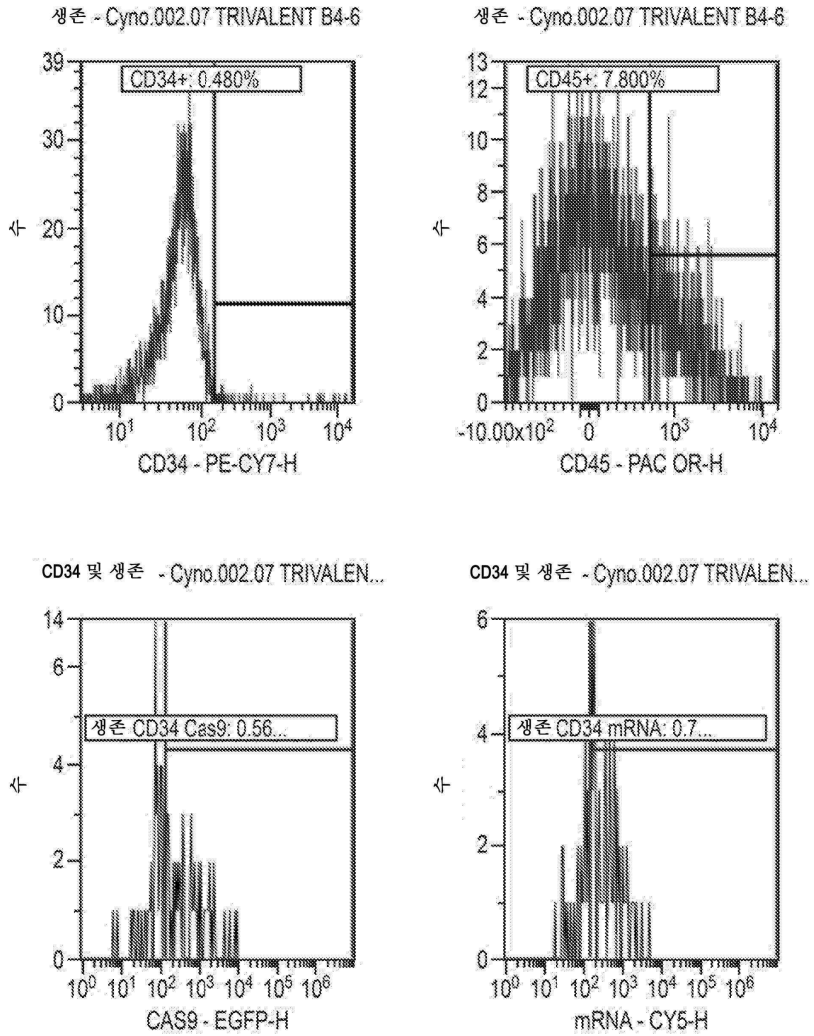
도면87b


모든 사건 - Cyno.002.07 TRIVALENT B4-6
R1: 92.710%
SSC-H (10^3)
FSC-H (10^3)
R1 - Cyno.002.07 TRIVALENT B4-6
R2: 79.650%
FSC-H
FSC-A
생존 - Cyno.002.07 TRIVALENT B4-6
CRISPR+: 5.020%
수
CAS9 - EGFP-H
생존 - Cyno.002.07 TRIVALENT B4-6
mRNA+: 0.320%
수
mRNA - CY5-H

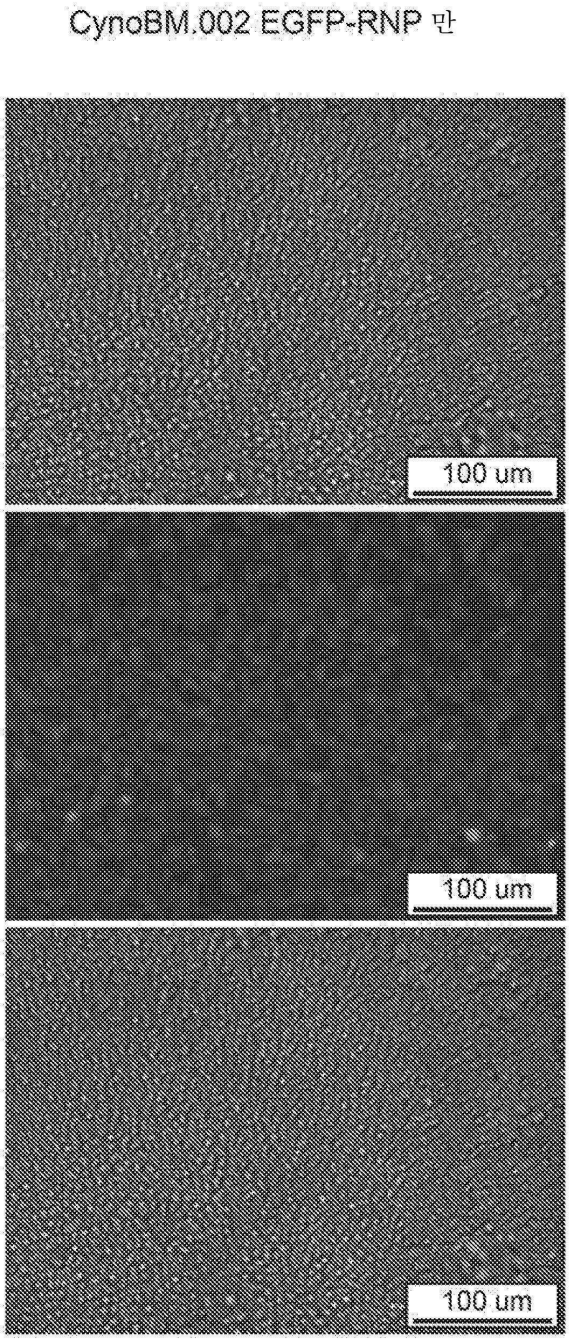
도면87c


R2 - Cyno.002.07 TRIVALENT B4-6
생존 : 37.360%
수
ZombieNearIR - APC Cy7-H
생존 - Cyno.002.07 TRIVALENT B4-6
fHbb+: 0.210%
수
FETAL HEMO - PE-H
생존 - Cyno.002.07 TRIVALENT B4-6
5.080%
0.210%
31.960%
0.110%
CAS9 - EGFP-H
mRNA - CY5-H
생존 - Cyno.002.07 TRIVALENT B4-6
CD3+: 4.280%
수
CD3 - PERCPCY5 5-H

도면87d

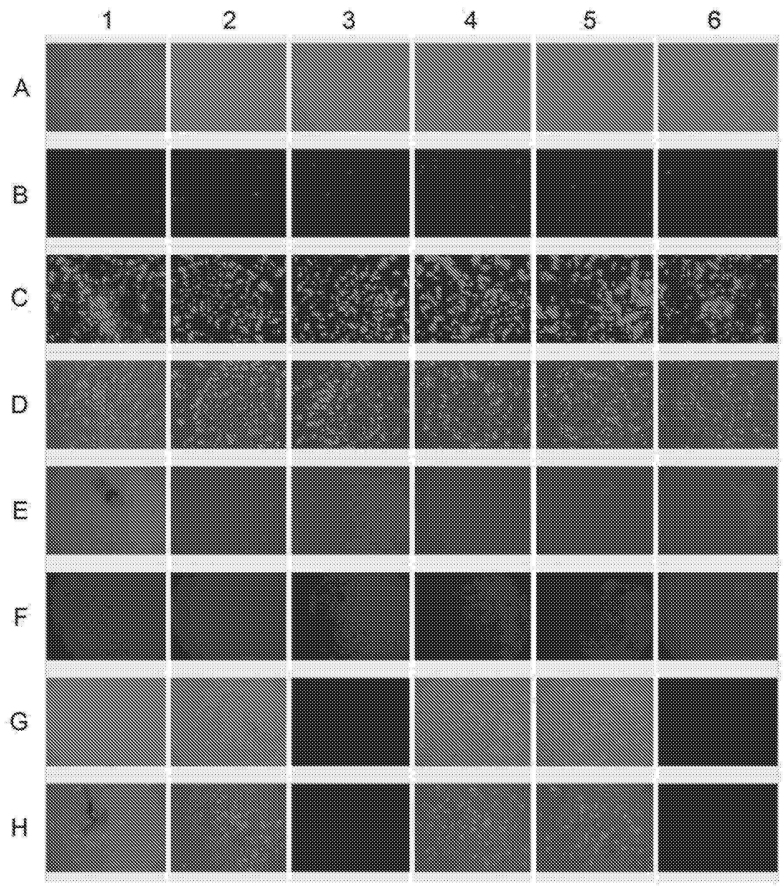

생존 - Cyno.002.07 TRIVALENT B4-6
CD34+: 0.480%
수
CD34 - PE-CY7-H
생존 - Cyno.002.07 TRIVALENT B4-6
CD45+: 7.800%
수
CD45 - PAC OR-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.07 TRIVALEN...
생존 CD34 Cas9: 0.56...
수
CAS9 - EGFP-H
CD34 및 생존 - Cyno.002.07 TRIVALEN...
생존 CD34 mRNA: 0.7...
수
mRNA - CY5-H

도면88

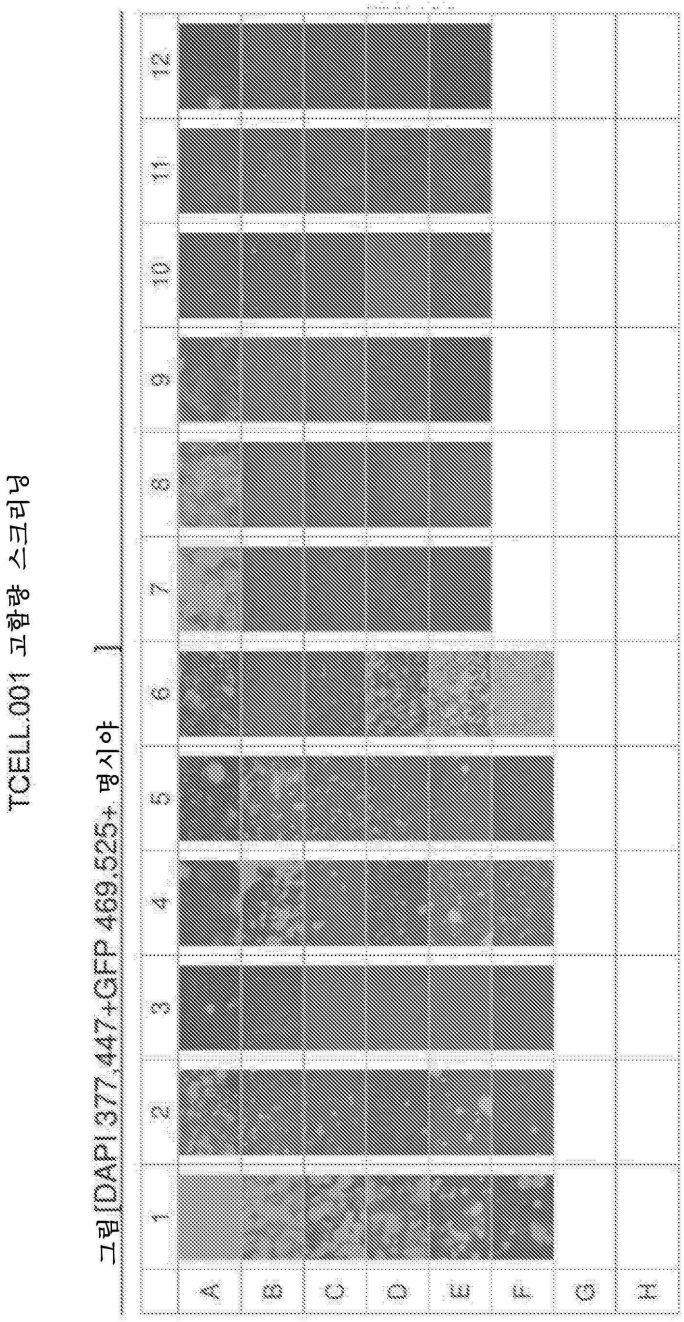


도면89

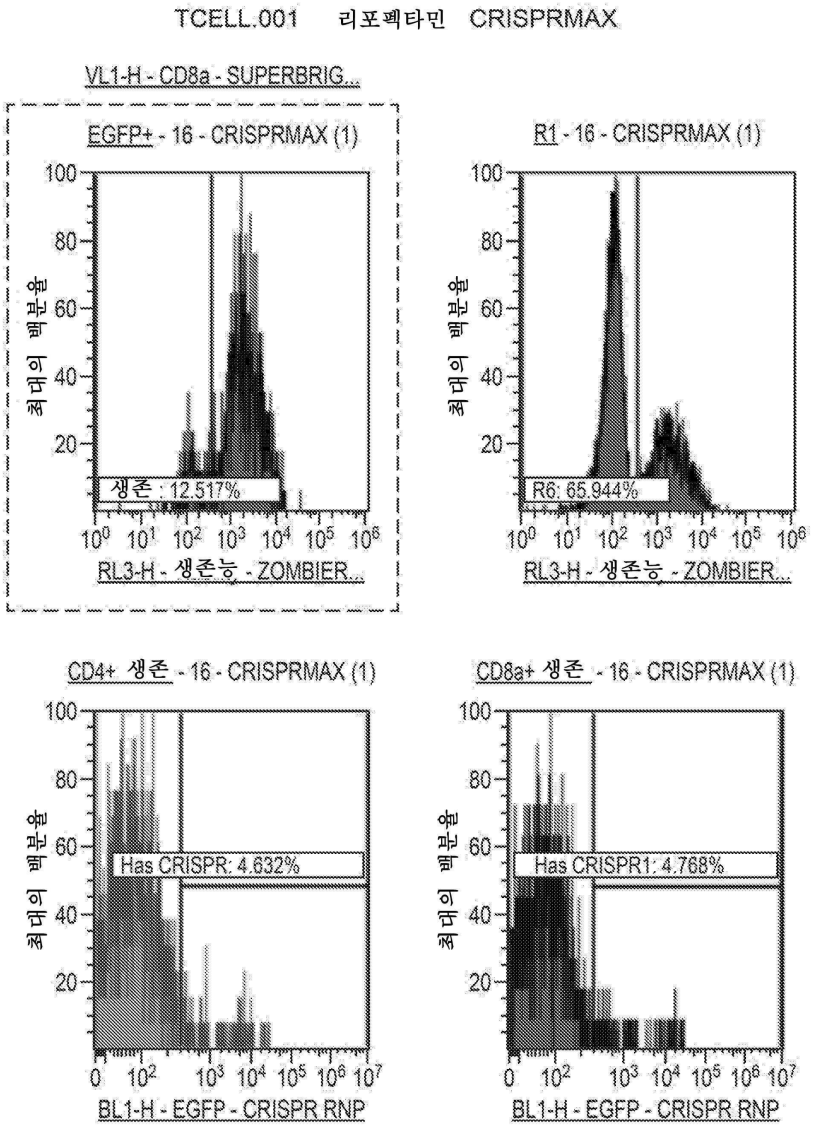
HSC.004 고함량 스크리닝



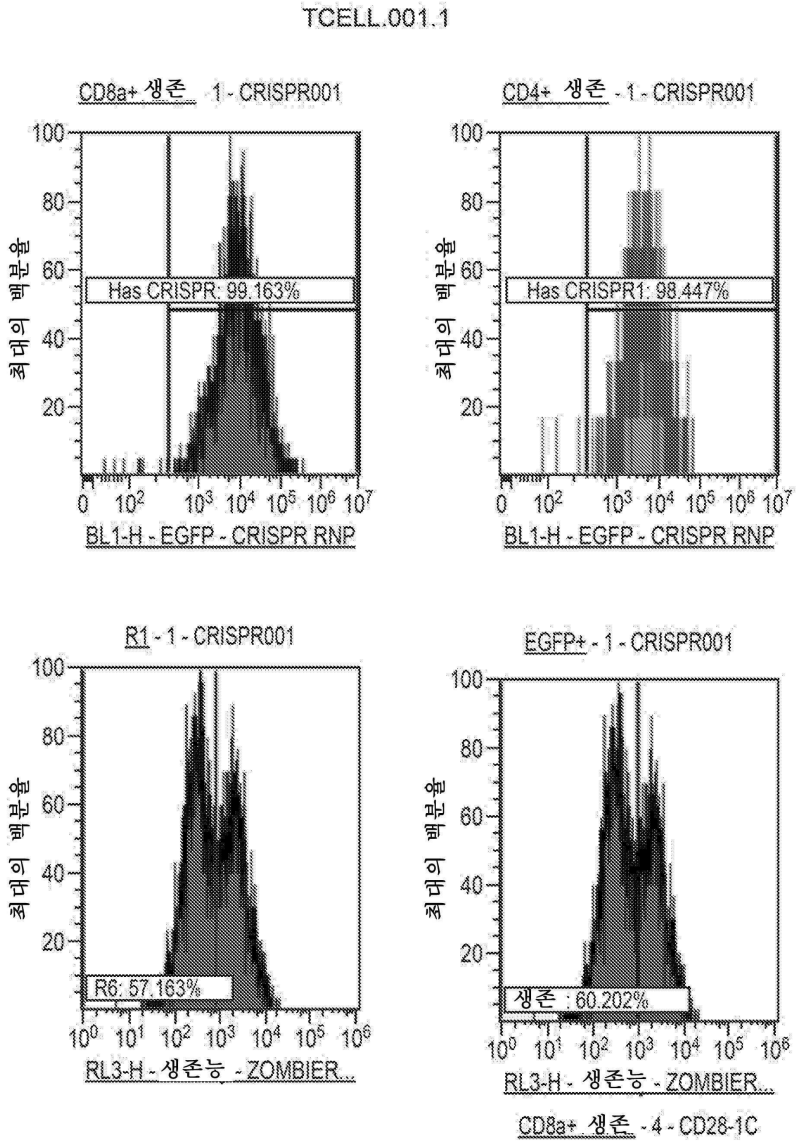
도면90


TCELL.001 고함량 스크리닝
그림[DAPI 377,447+GFP 469,525+ 평시야
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
A
B
C
D
E
F
G
H

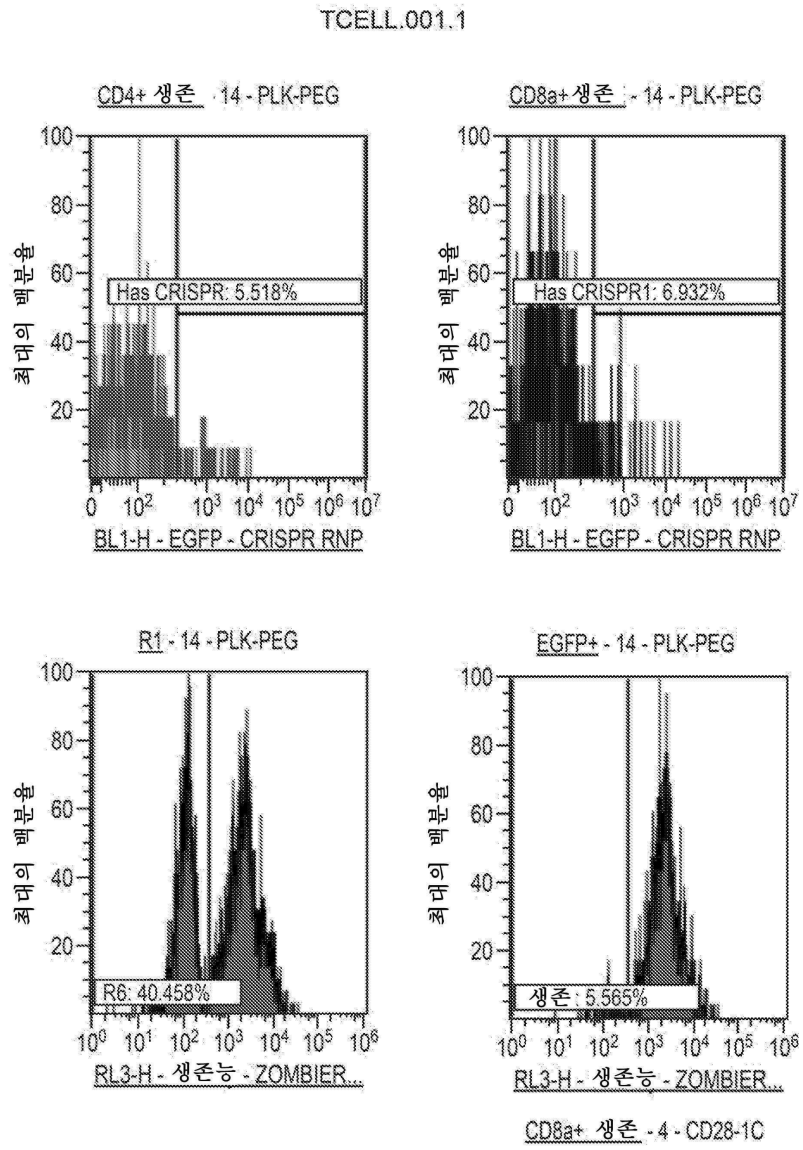
도면91


TCELL.001 리포펙타민 CRISPRMAX
VL1-H - CD8a - SUPERBRIG...
EGFP+ - 16 - CRISPRMAX (1)
최대의 백분율
생존 : 12.517%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
R1 - 16 - CRISPRMAX (1)
R6: 65.944%
CD4+ 생존 - 16 - CRISPRMAX (1)
Has CRISPR: 4.632%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
CD8a+ 생존 - 16 - CRISPRMAX (1)
Has CRISPR1: 4.768%

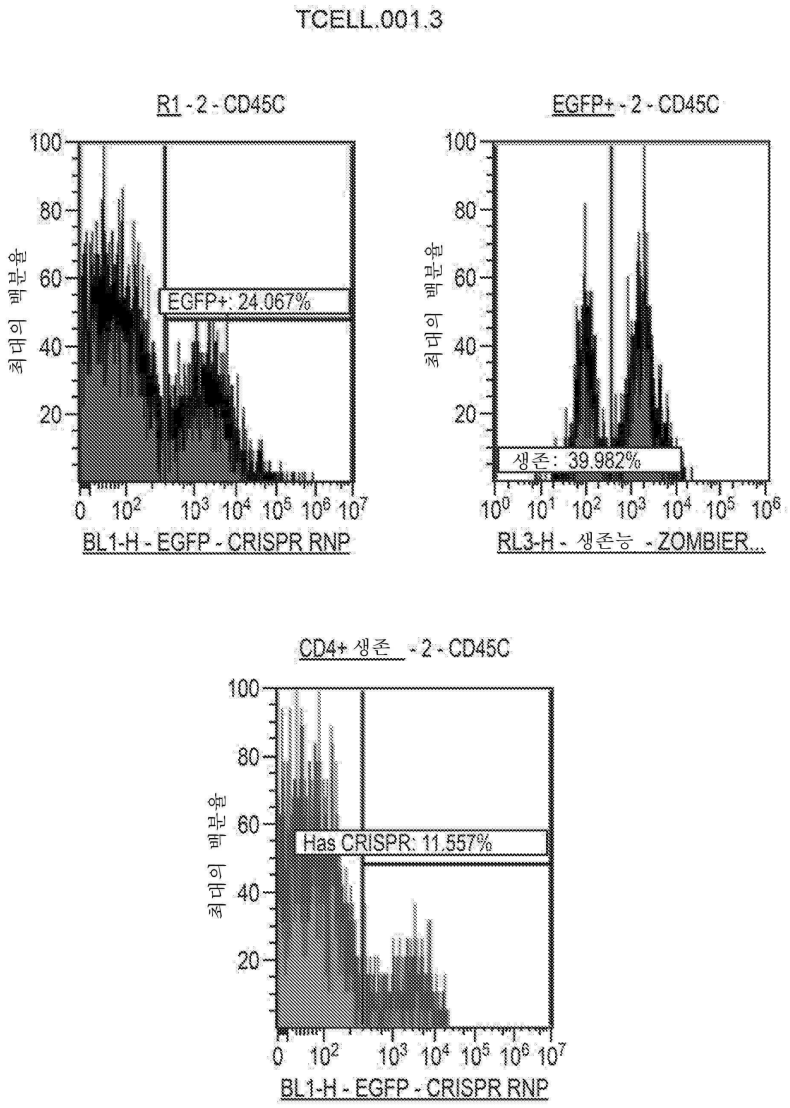
도면92


TCELL.001.1
CD8a+ 생존 1 - CRISPR001
Has CRISPR: 99.163%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
CD4+ 생존 - 1 - CRISPR001
Has CRISPR1: 98.447%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
R1 - 1 - CRISPR001
R6: 57.163%
최대의 백분율
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
EGFP+ - 1 - CRISPR001
생존 : 60.202%
최대의 백분율
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
CD8a+ 생존 - 4 - CD28-1C

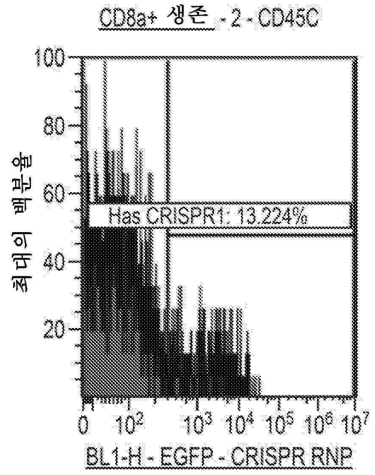
도면93

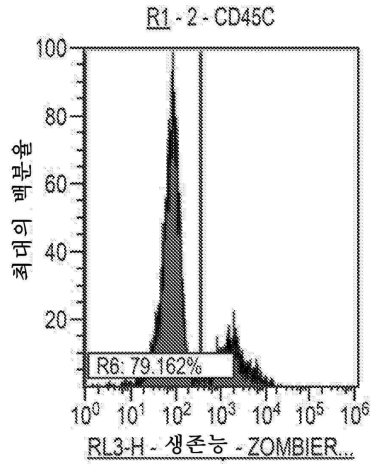

TCELL.001.1
CD4+ 생존 - 14 - PLK-PEG
Has CRISPR: 5.518%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
CD8a+생존 - 14 - PLK-PEG
Has CRISPR1: 6.932%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
R1 - 14 - PLK-PEG
R6: 40.458%
최대의 백분율
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
EGFP+ - 14 - PLK-PEG
생존 : 5.565%
최대의 백분율
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
CD8a+ 생존 - 4 - CD28-1C

도면94a

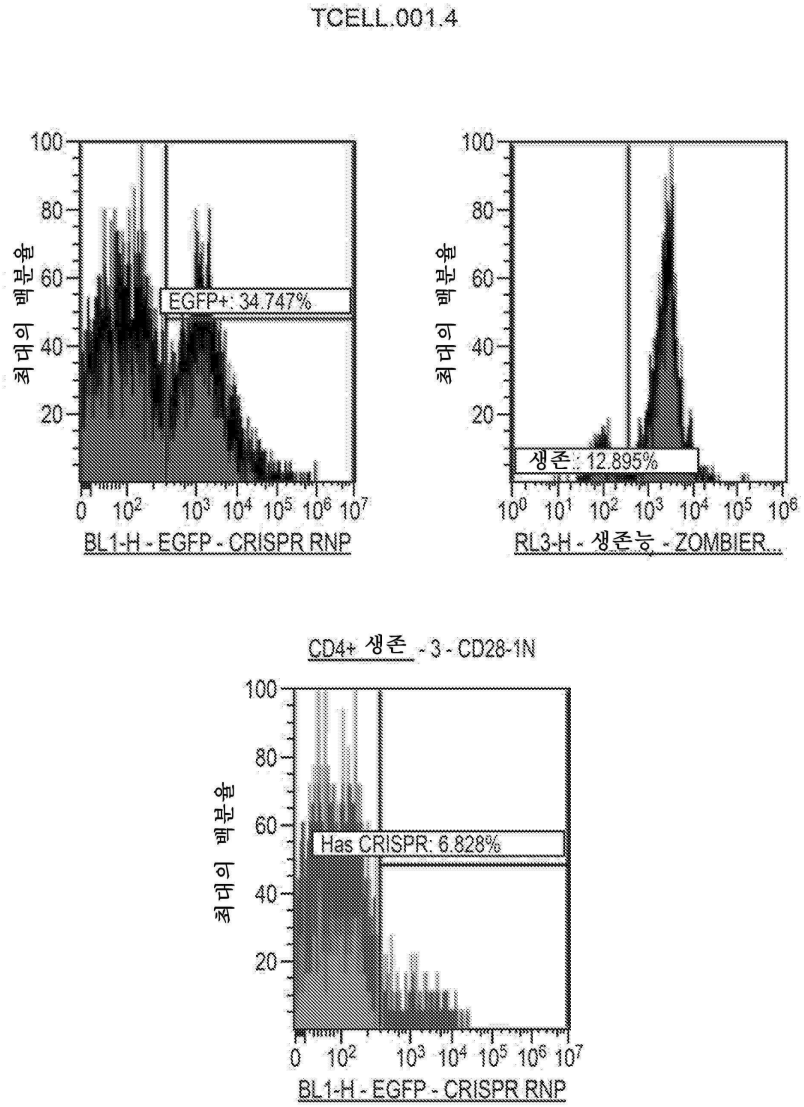

TCELL.001.3
R1 - 2 - CD45C
EGFP+: 24.067%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
EGFP+ - 2 - CD45C
생존 : 39.982%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
CD4+ 생존 - 2 - CD45C
Has CRISPR: 11.557%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

도면94b

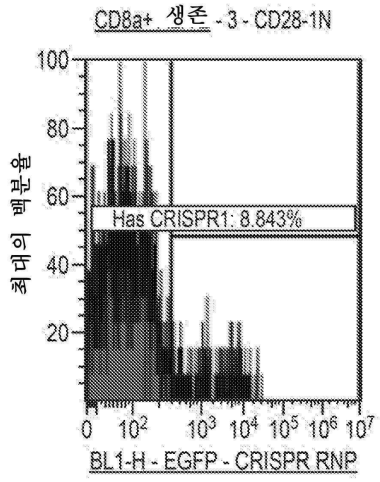

CD8a+ 생존 - 2 - CD45C
최대의 백분율
Has CRISPR1: 13.224%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

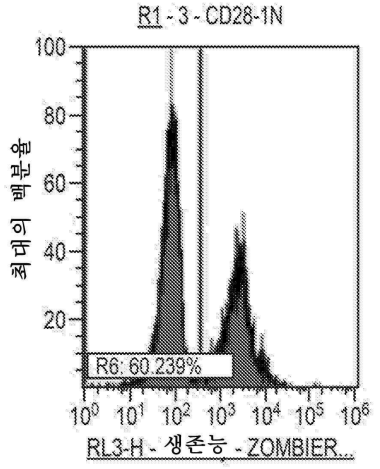

R1 - 2 - CD45C
최대의 백분율
R6: 79.162%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

도면95a

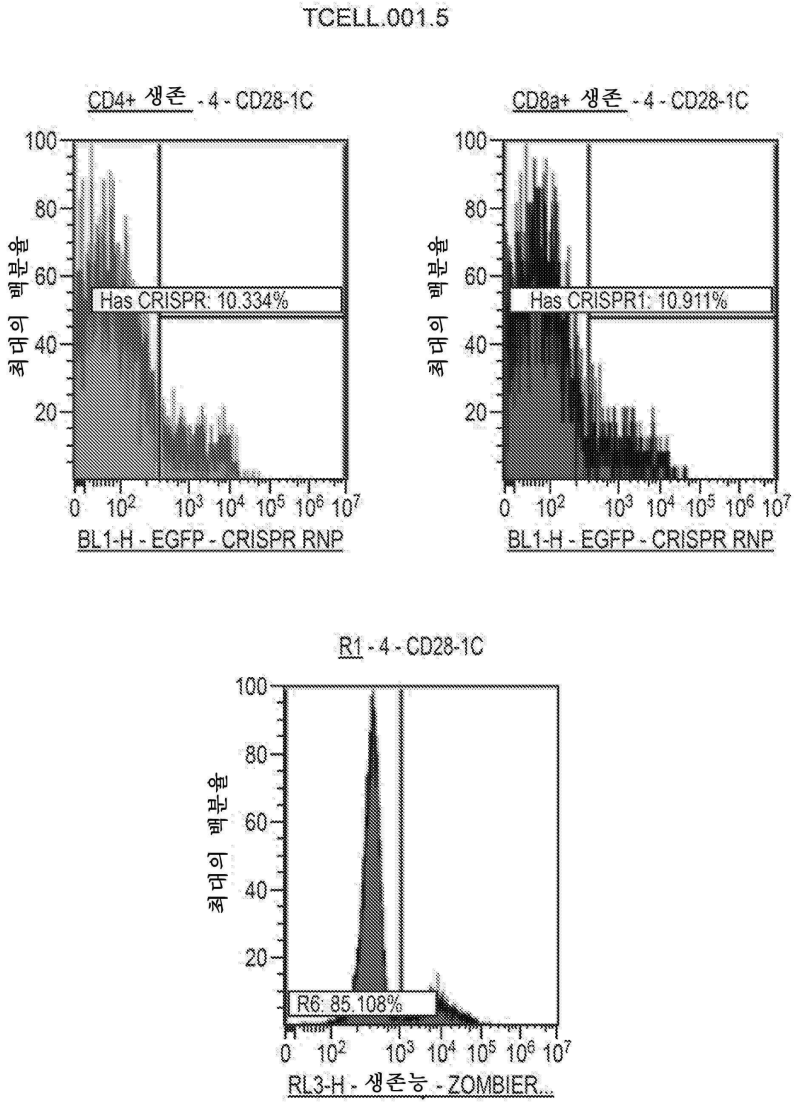

TCELL.001.4
최대의 백분율
EGFP+: 34.747%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
생존 : 12.895%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
CD4+ 생존 - 3 - CD28-1N
Has CRISPR: 6.828%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

도면95b

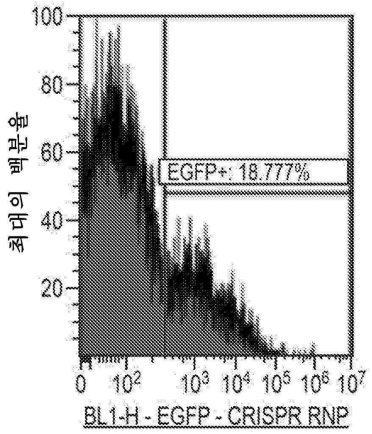

CD8a+ 생존 - 3 - CD28-1N
최대의 백분율
Has CRISPR1: 8.843%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

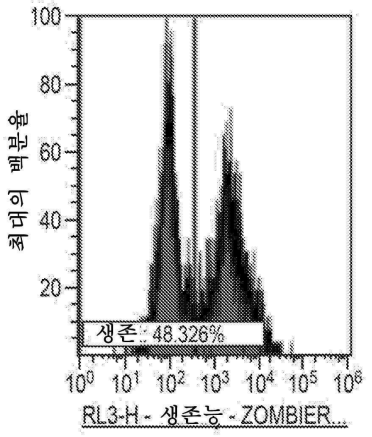

R1 - 3 - CD28-1N
최대의 백분율
R6: 60.239%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

도면96a

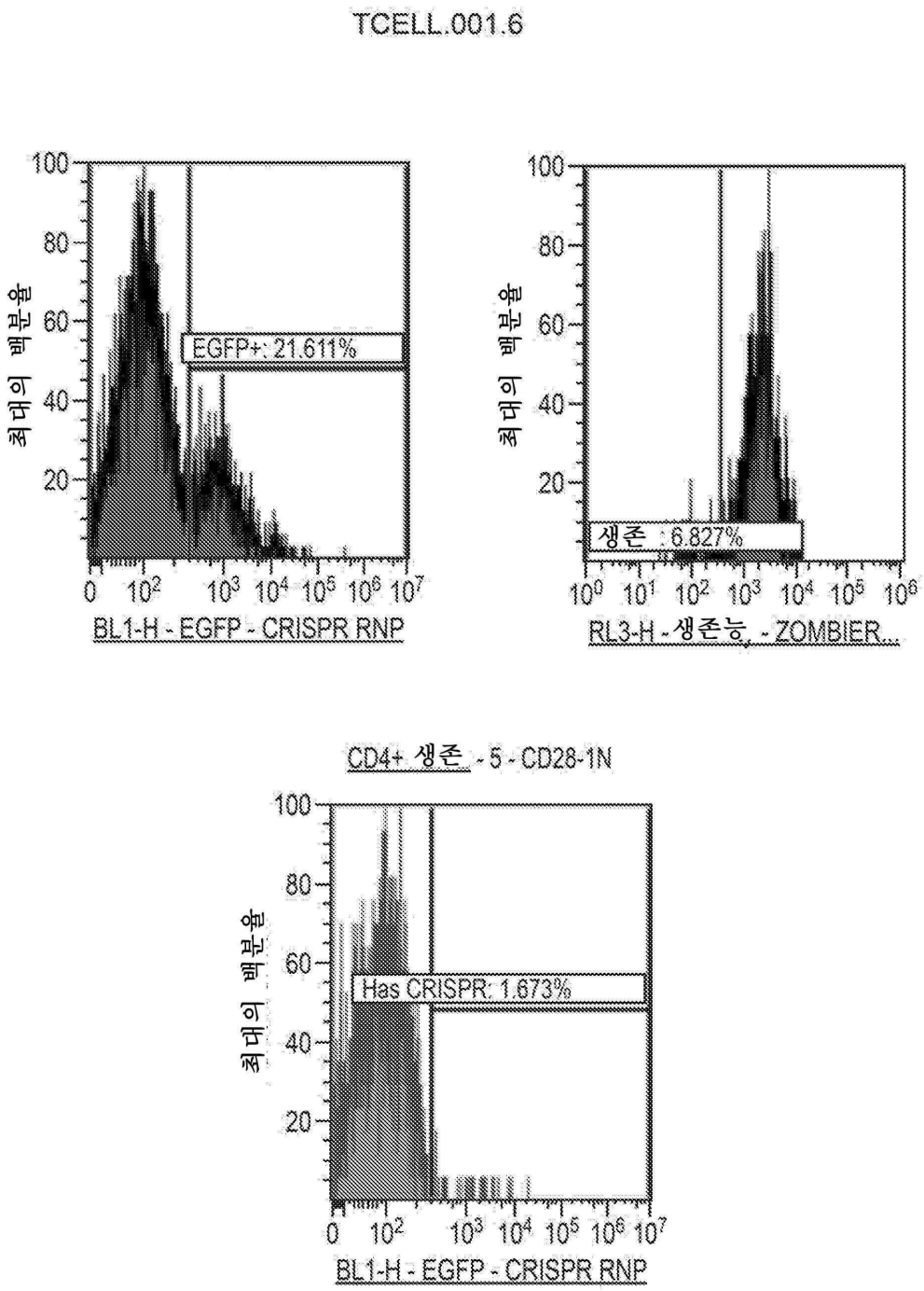

TCELL.001.5
CD4+ 생존 - 4 - CD28-1C
Has CRISPR: 10.334%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
CD8a+ 생존 - 4 - CD28-1C
Has CRISPR1: 10.911%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
R1 - 4 - CD28-1C
R6: 85.108%
최대의 백분율
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

도면96b

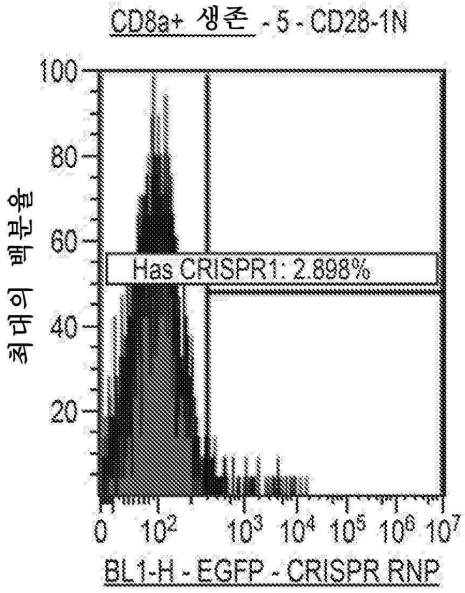

100
80
60
40
20
최대의 백분율
EGFP+: 18.777%
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

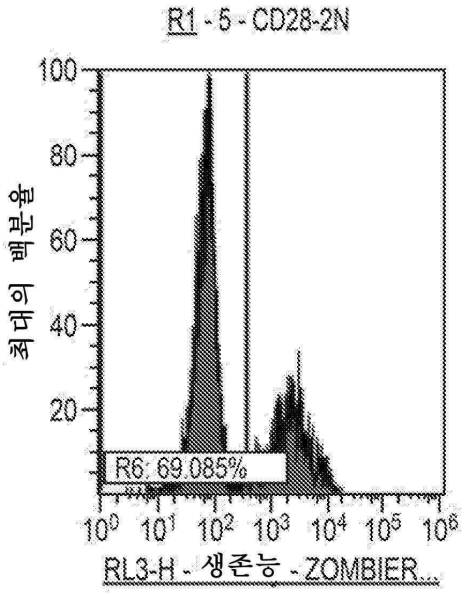

100
80
60
40
20
최대의 백분율
생존: 48.326%
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

도면97a

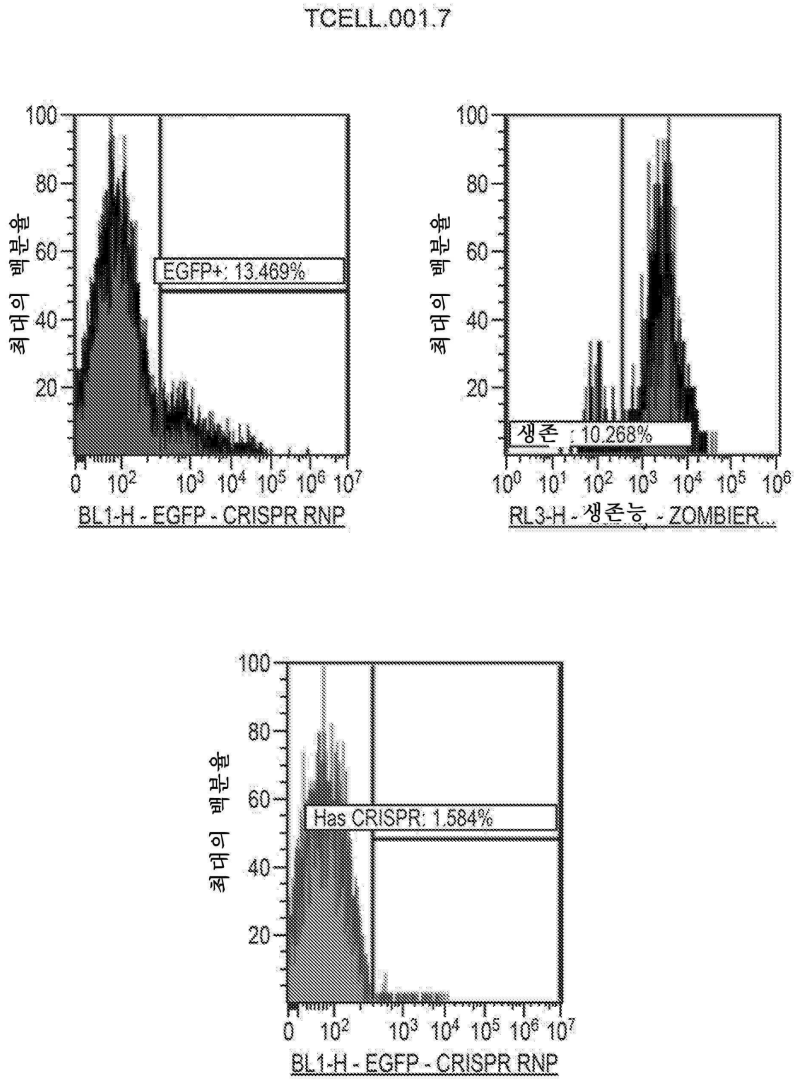

TCELL.001.6
최대의 백분율
EGFP+: 21.611%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
생존 : 6.827%
RL3-H - 생존능, - ZOMBIER...
CD4+ 생존 - 5 - CD28-1N
Has CRISPR: 1.673%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

도면97b

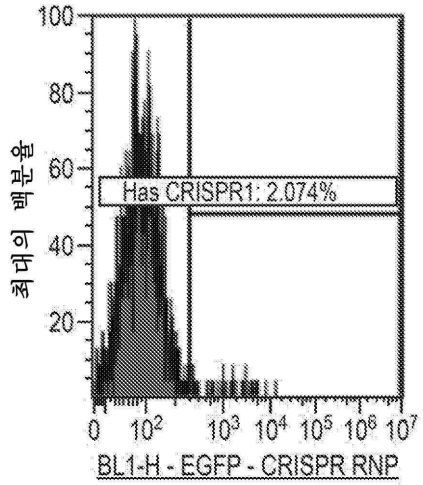

CD8a+ 생존 - 5 - CD28-1N
100
80
60
40
20
최대의 백분율
Has CRISPR1: 2.898%
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

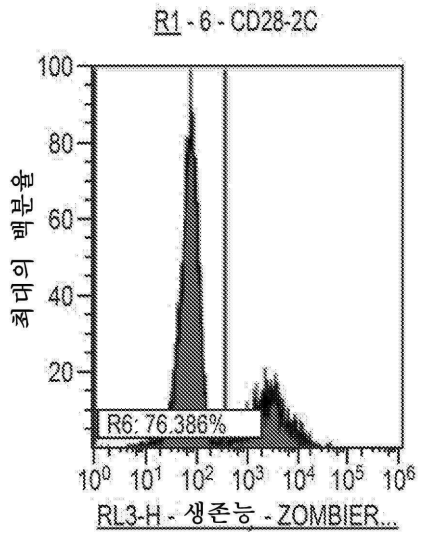

R1 - 5 - CD28-2N
100
80
60
40
20
최대의 백분율
R6: 69.085%
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

도면98a

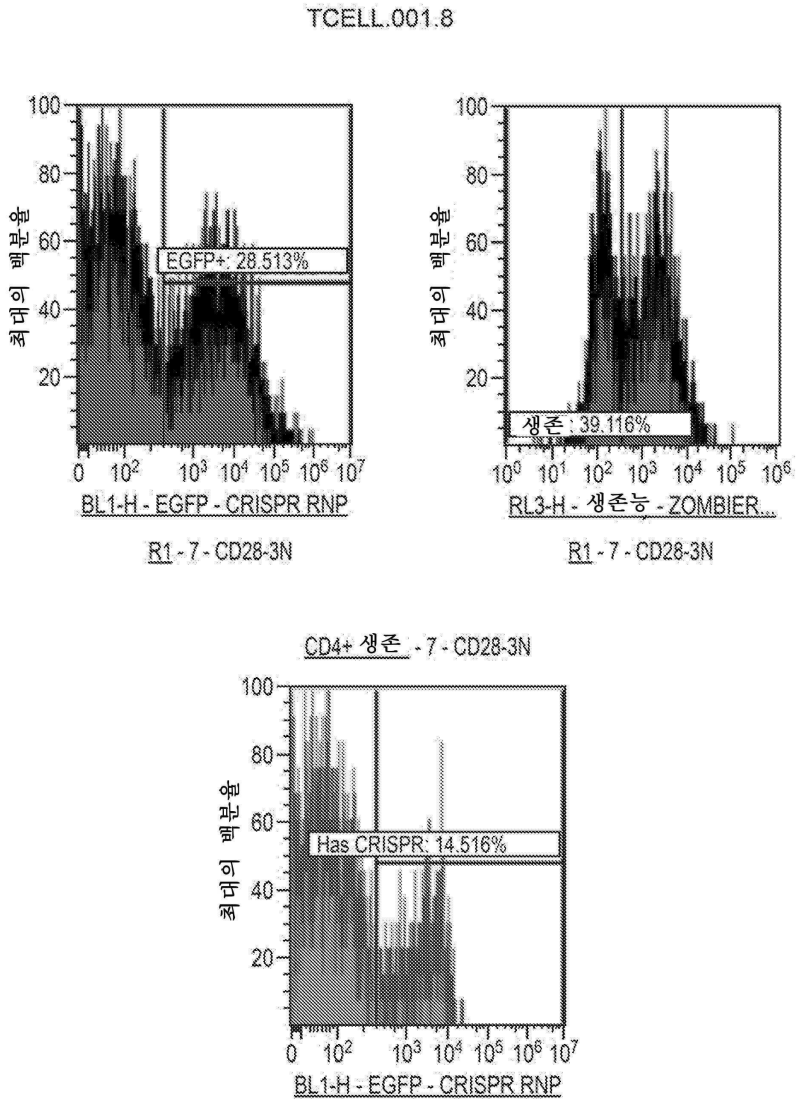

TCELL.001.7
최대의 백분율
EGFP+: 13.469%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
생존 : 10.268%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
Has CRISPR: 1.584%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

도면98b

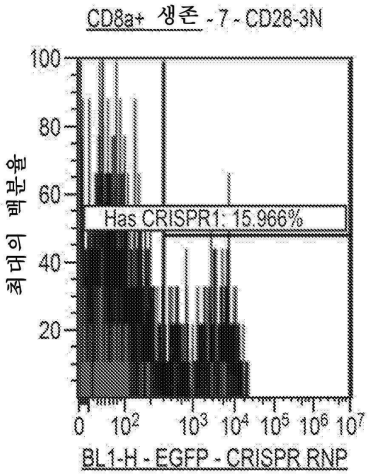

100
80
60
40
20
최대의 백분율
Has CRISPR1: 2.074%
0 10² 10³ 10⁴ 10⁵ 10⁶ 10⁷
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

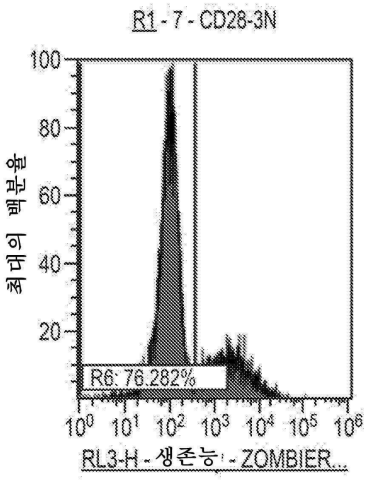

R1 - 6 - CD28-2C
100
80
60
40
20
최대의 백분율
R6: 76.386%
10⁰ 10¹ 10² 10³ 10⁴ 10⁵ 10⁶
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

도면99a

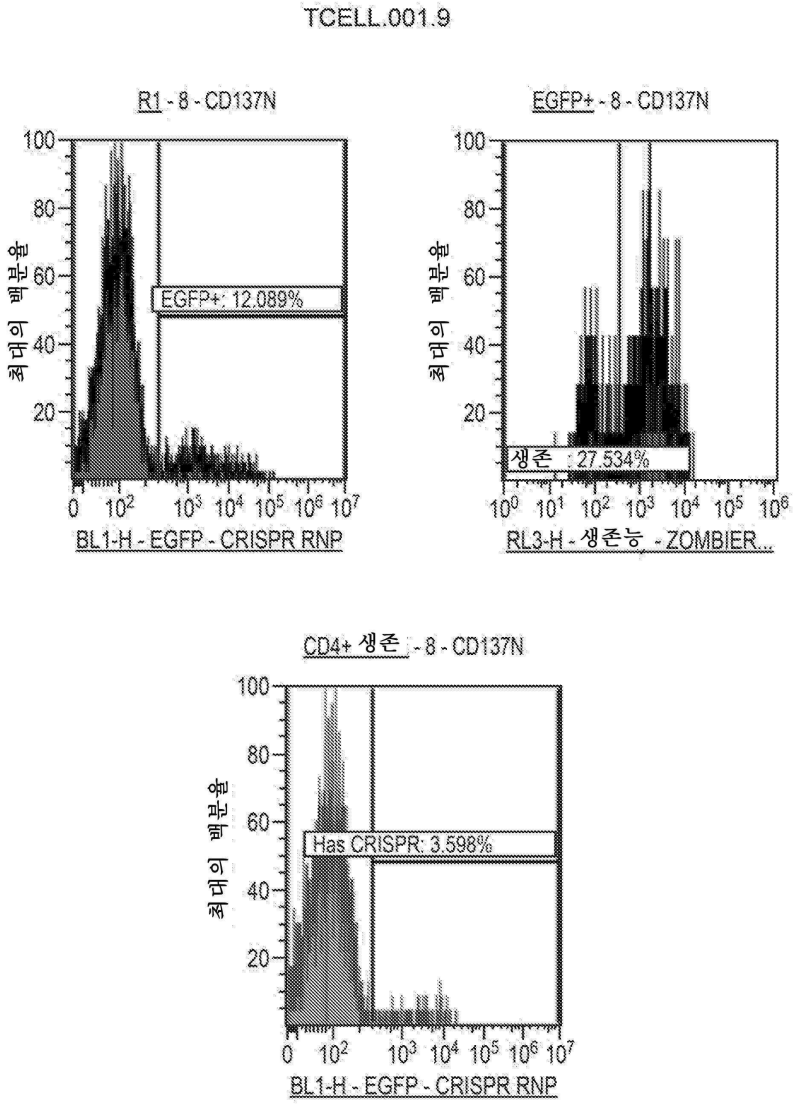

TCELL.001.8
최대의 백분율
EGFP+: 28.513%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
R1 - 7 - CD28-3N
생존 : 39.116%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
R1 - 7 - CD28-3N
CD4+ 생존 - 7 - CD28-3N
Has CRISPR: 14.516%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

도면99b

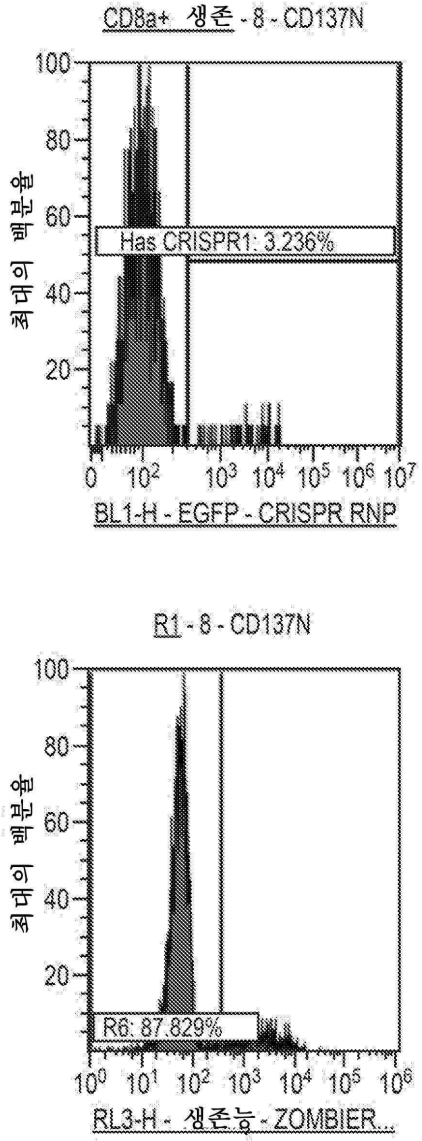

CD8a+ 생존 - 7 - CD28-3N
최대의 백분율
Has CRISPR1: 15.966%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP


R1 - 7 - CD28-3N
최대의 백분율
R6: 76.282%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

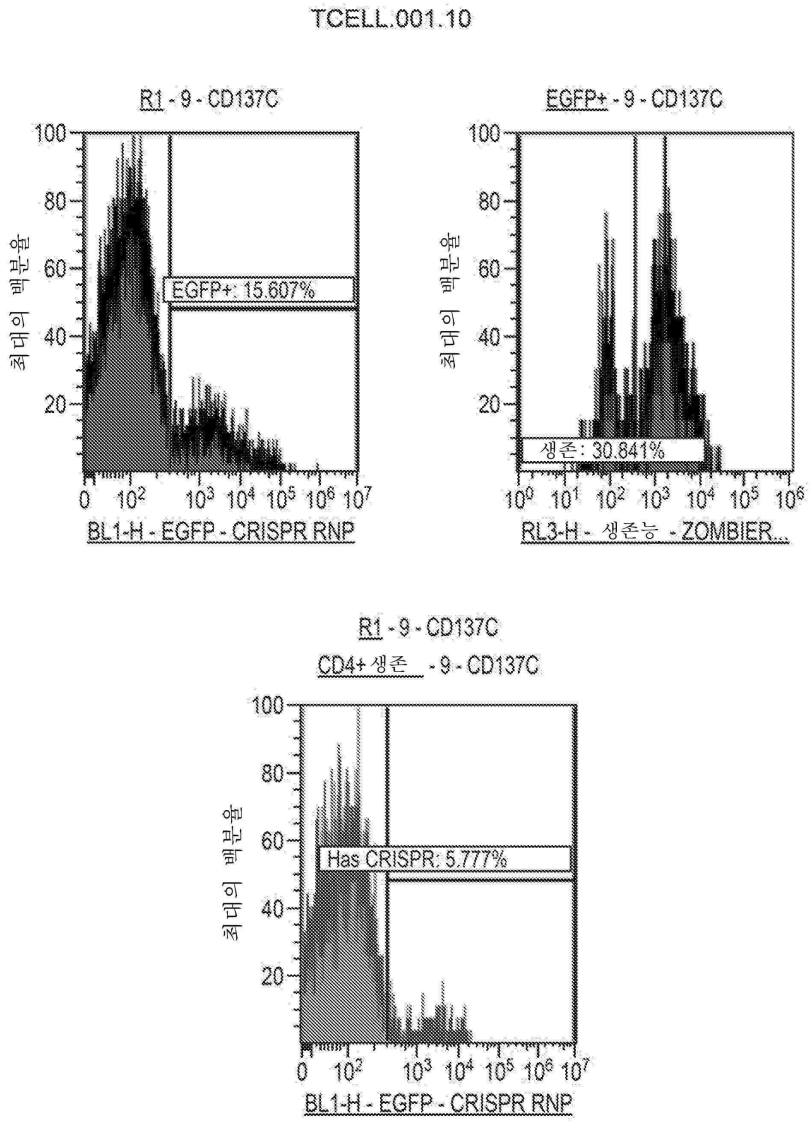
도면100a


TCELL.001.9
R1 - 8 - CD137N
EGFP+: 12.089%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
EGFP+ - 8 - CD137N
생존 : 27.534%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
CD4+ 생존 - 8 - CD137N
Has CRISPR: 3.598%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

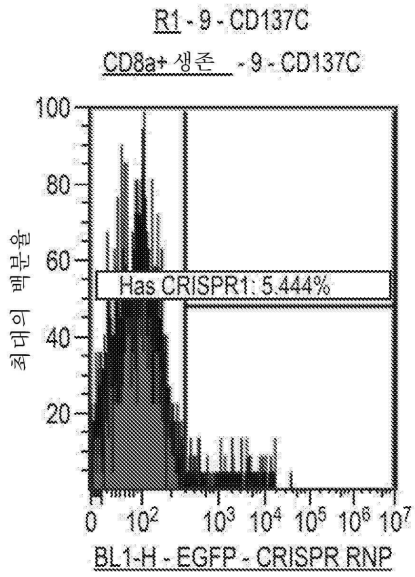
도면100b

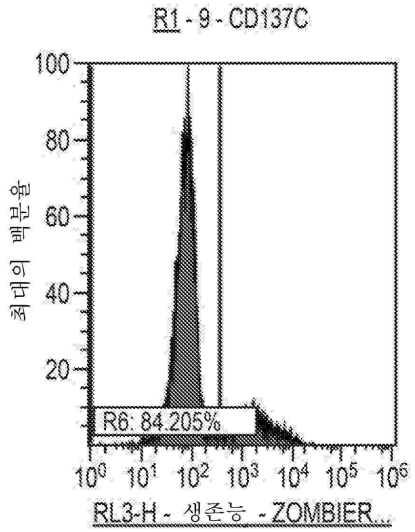

CD8a+ 생존 - 8 - CD137N
최대의 백분율
Has CRISPR1: 3.236%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
R1 - 8 - CD137N
최대의 백분율
R6: 87.829%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

도면101a

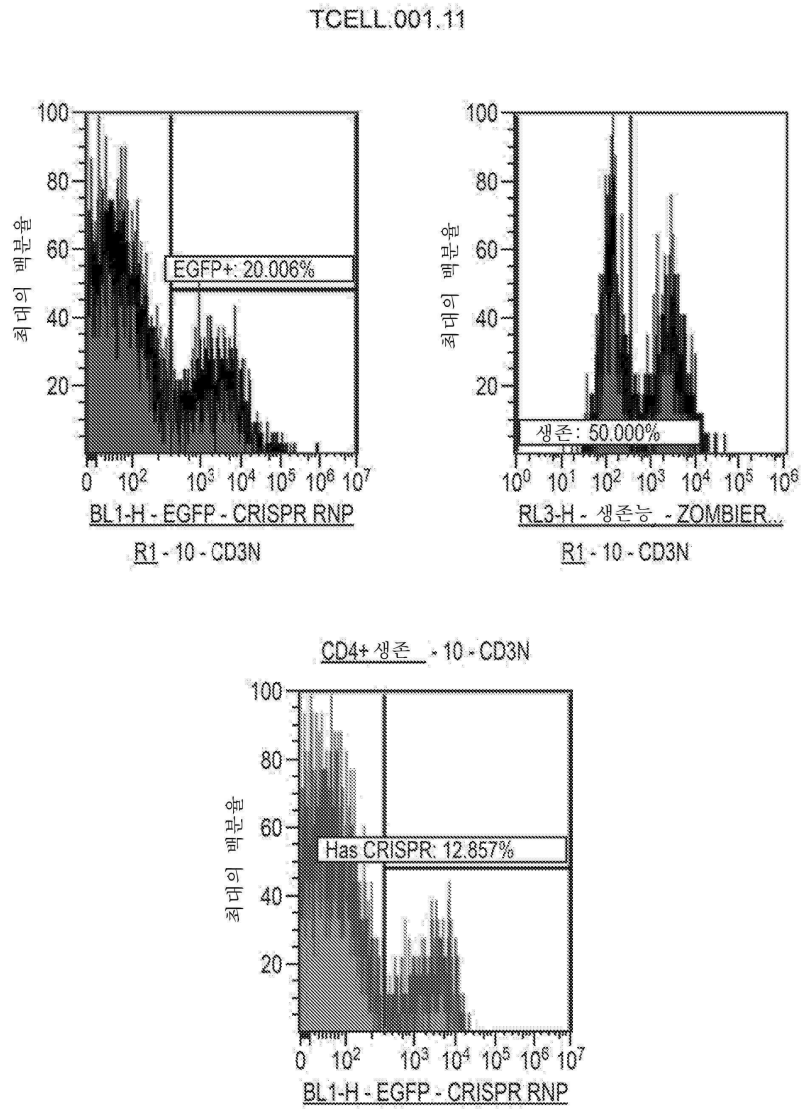

TCELL.001.10
R1 - 9 - CD137C
EGFP+: 15.607%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
EGFP+ - 9 - CD137C
생존: 30.841%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
R1 - 9 - CD137C
CD4+ 생존 - 9 - CD137C
Has CRISPR: 5.777%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

도면101b

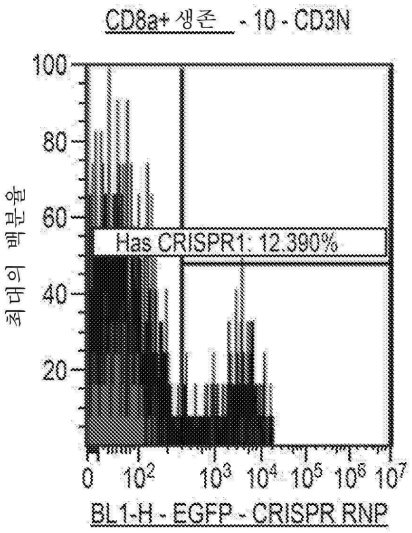

R1 - 9 - CD137C
CD8a+ 생존 - 9 - CD137C
100
80
60
40
20
최대의 백분율
Has CRISPR1: 5.444%
0
10²
10³
10⁴
10⁵
10⁶
10⁷
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

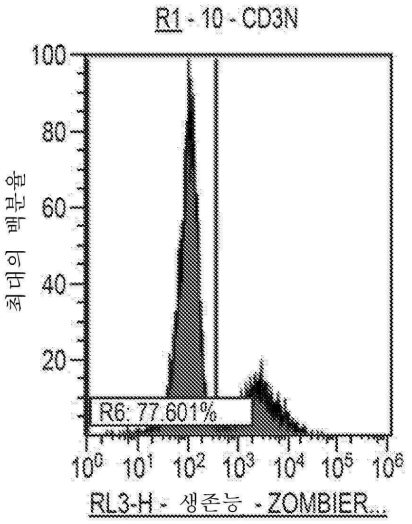

R1 - 9 - CD137C
100
80
60
40
20
최대의 백분율
R6: 84.205%
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
10⁵
10⁶
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

도면102a

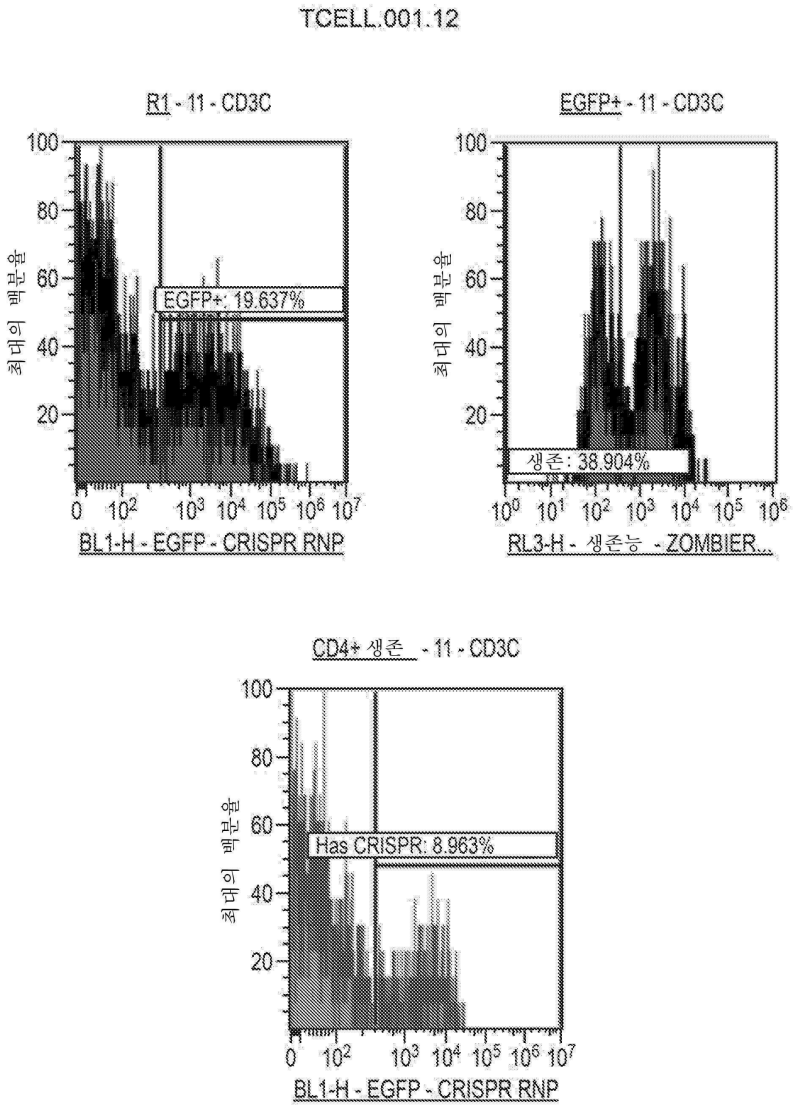

TCELL.001.11
최대의 백분율
EGFP+: 20.006%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
R1 - 10 - CD3N
생존 : 50.000%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
R1 - 10 - CD3N
CD4+ 생존 - 10 - CD3N
Has CRISPR: 12.857%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

도면102b

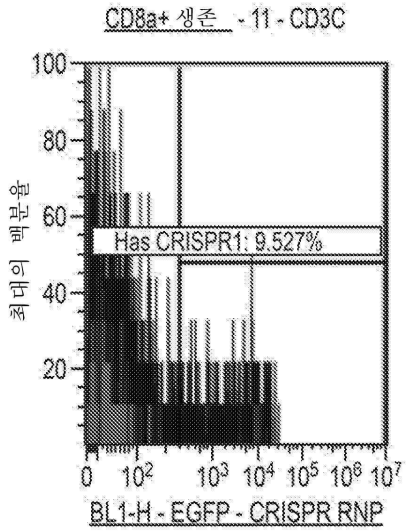

CD8a+ 생존 - 10 - CD3N
100
80
60
40
20
최대의 백분율
Has CRISPR1: 12.390%
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

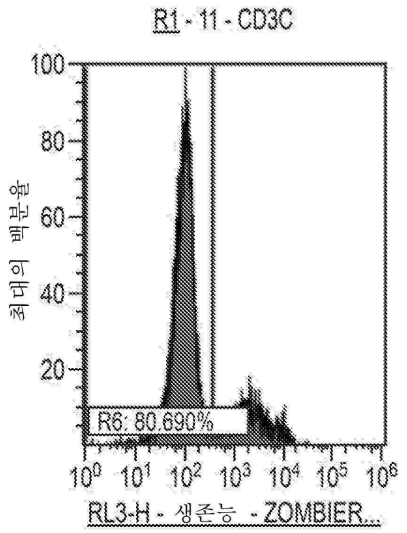

R1 - 10 - CD3N
100
80
60
40
20
최대의 백분율
R6: 77.601%
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

도면103a

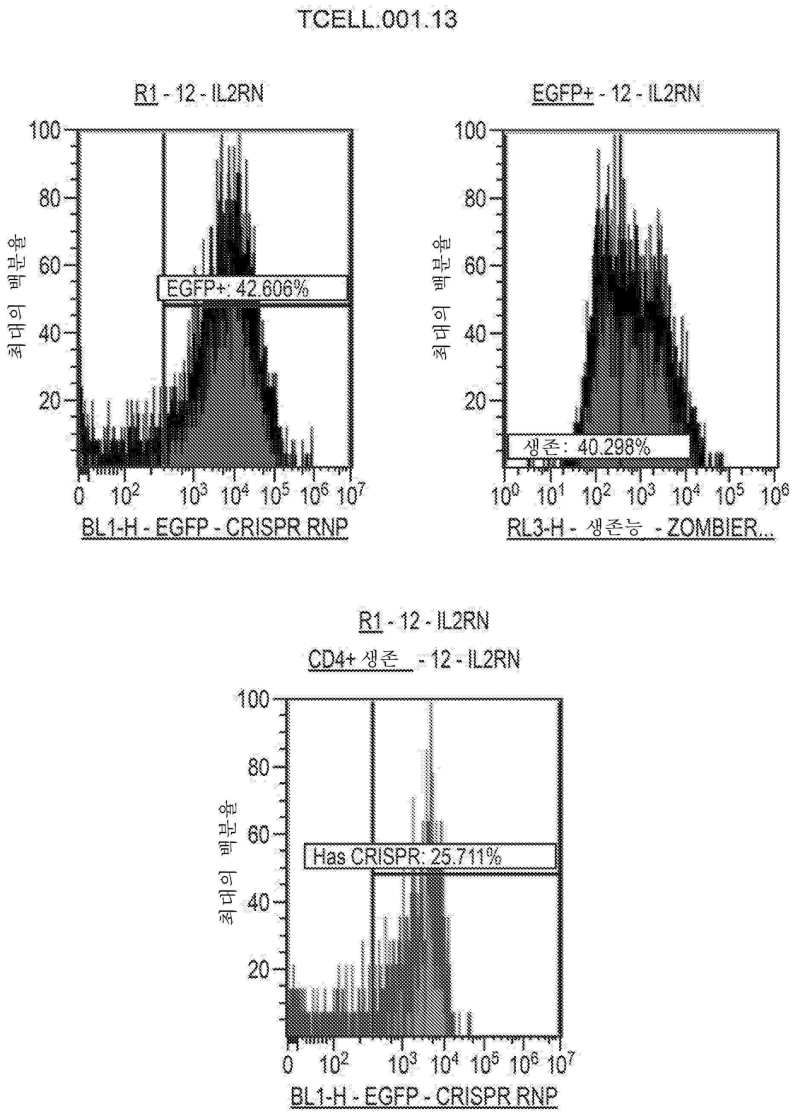

TCELL.001.12
R1 - 11 - CD3C
EGFP+: 19.637%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
EGFP+ - 11 - CD3C
생존: 38.904%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
CD4+ 생존 - 11 - CD3C
Has CRISPR: 8.963%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

도면103b

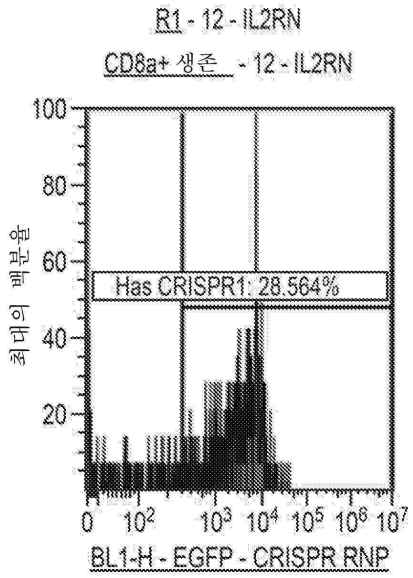

CD8a+ 생존 - 11 - CD3C
100
80
60
40
20
최대의 백분율
Has CRISPR1: 9.527%
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

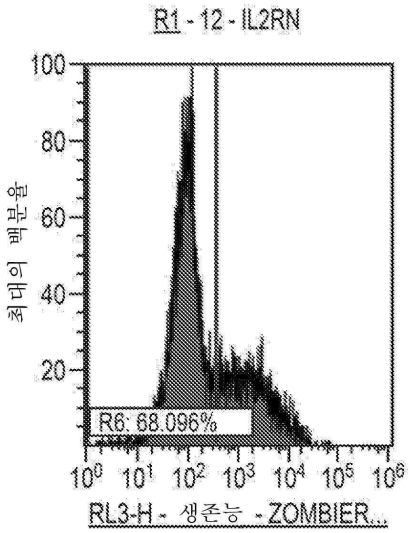

R1 - 11 - CD3C
100
80
60
40
20
최대의 백분율
R6: 80.690%
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

도면104a

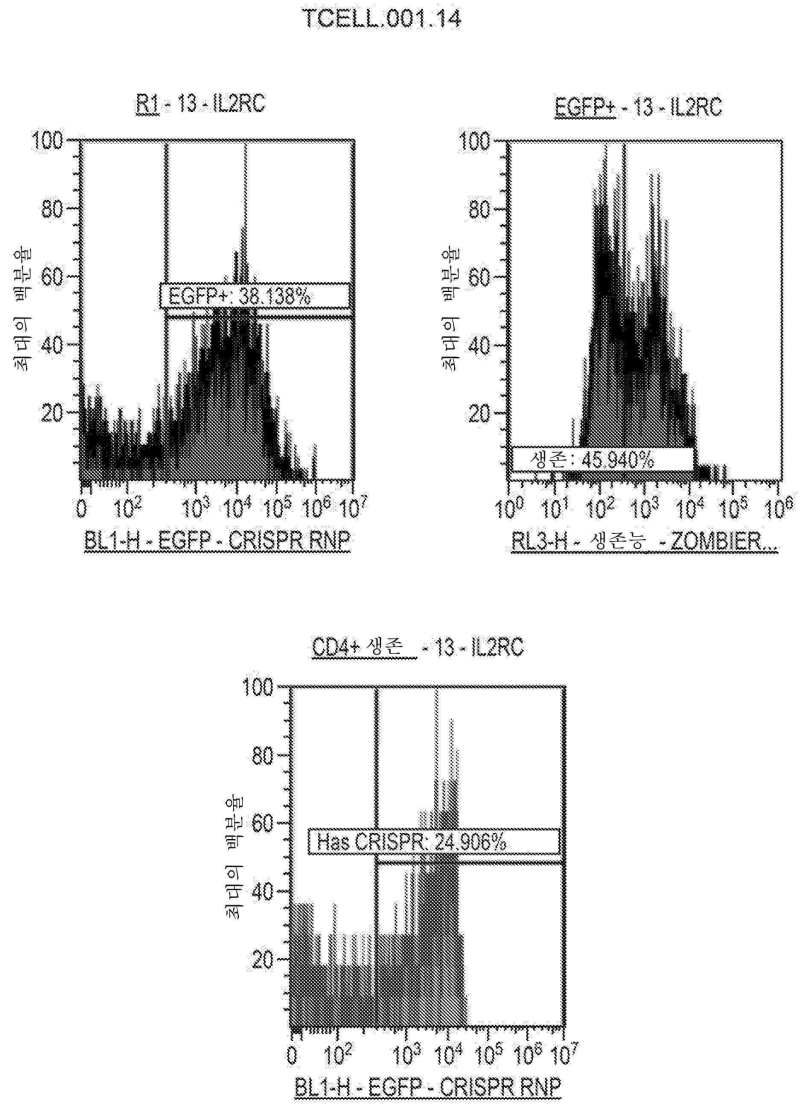

TCELL.001.13
R1 - 12 - IL2RN
EGFP+ - 12 - IL2RN
최대의 백분율
EGFP+: 42.606%
생존: 40.298%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
R1 - 12 - IL2RN
CD4+ 생존 - 12 - IL2RN
Has CRISPR: 25.711%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

도면104b

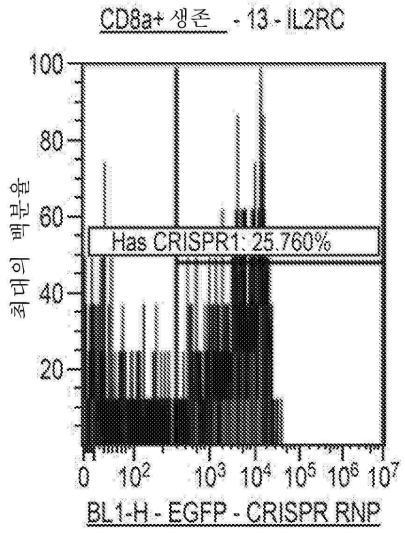

R1 - 12 - IL2RN
CD8a+ 생존 - 12 - IL2RN
최대의 백분율
Has CRISPR1: 28.564%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

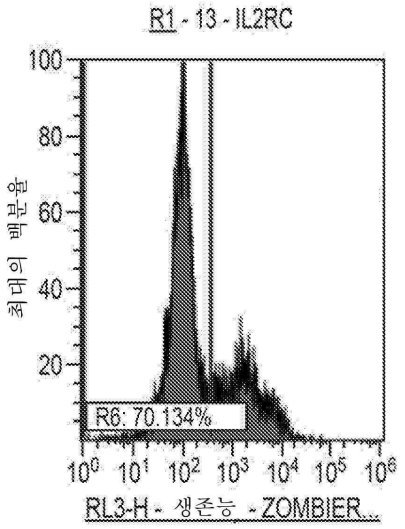

R1 - 12 - IL2RN
최대의 백분율
R6: 68.096%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

도면105a

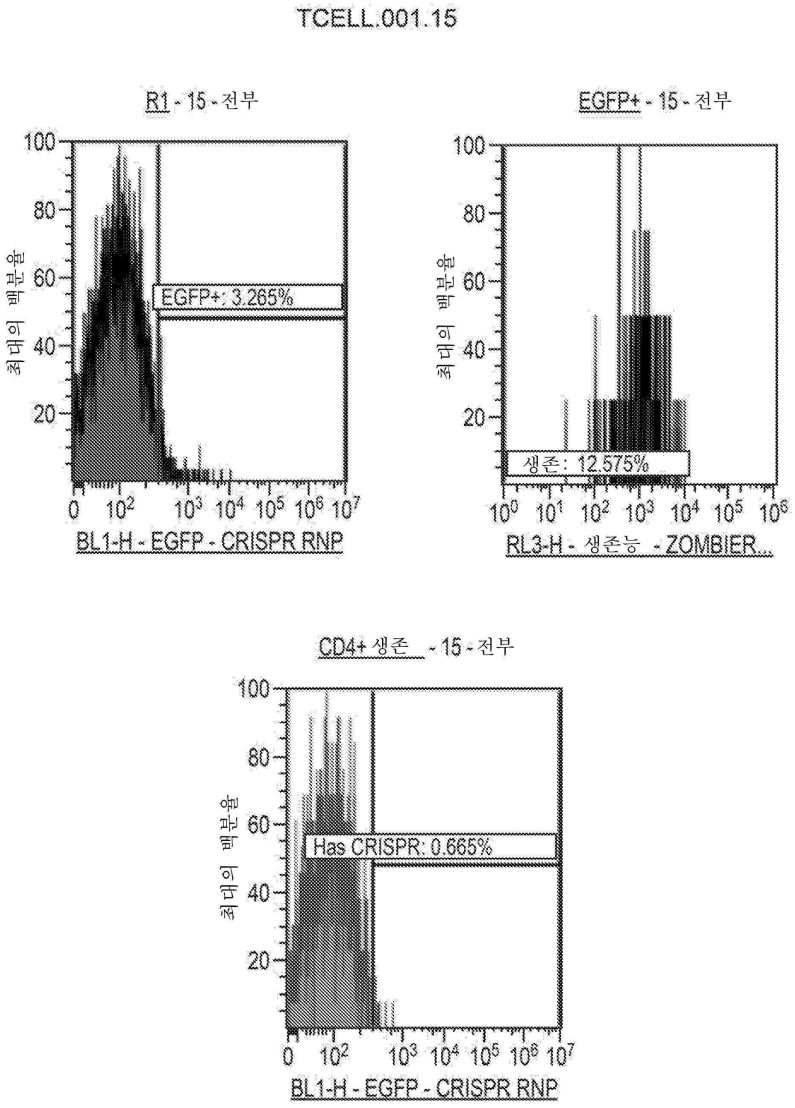

TCELL.001.14
R1 - 13 - IL2RC
EGFP+ - 13 - IL2RC
최대의 백분율
EGFP+: 38.138%
생존: 45.940%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
CD4+ 생존 - 13 - IL2RC
Has CRISPR: 24.906%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

도면105b

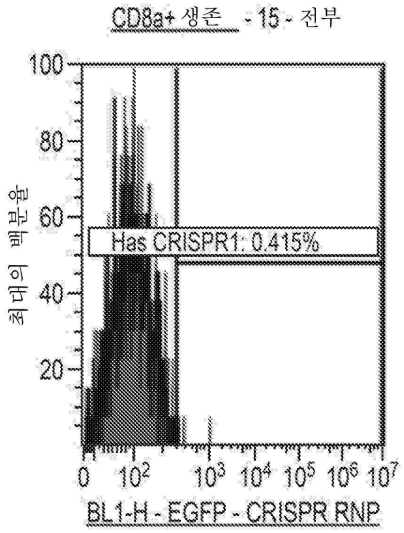

CD8a+ 생존 - 13 - IL2RC
100
80
60
40
20
최대의 백분율
Has CRISPR1: 25.760%
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

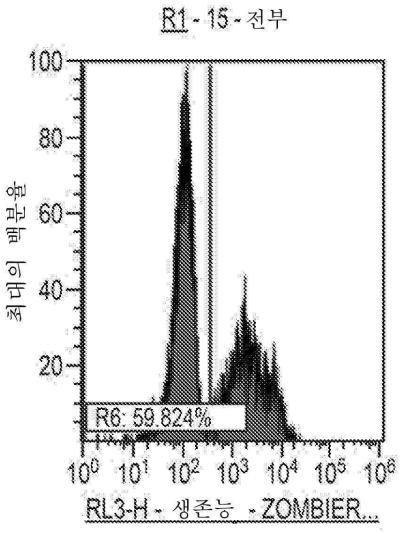

R1 - 13 - IL2RC
100
80
60
40
20
최대의 백분율
R6: 70.134%
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

도면106a

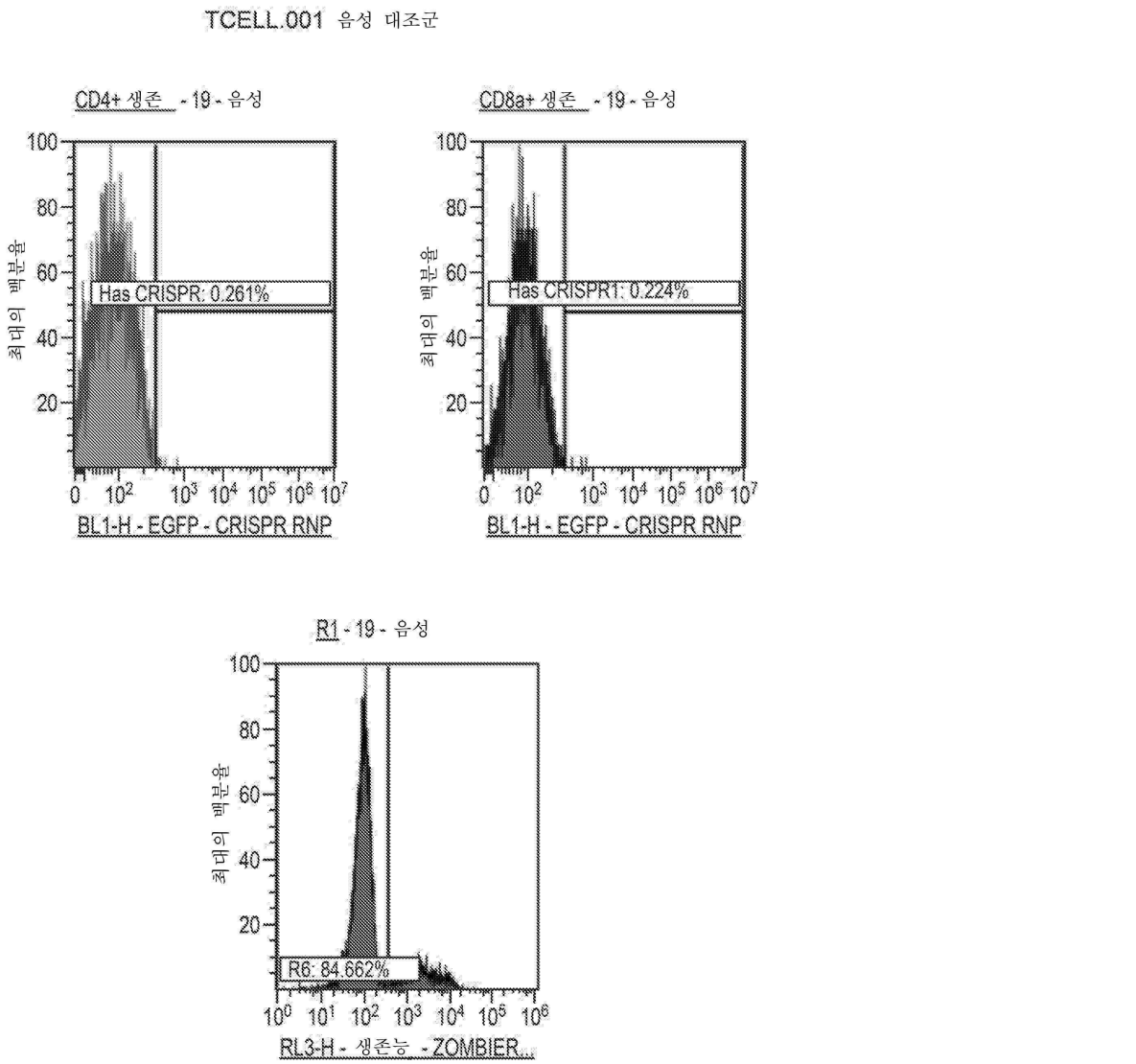

TCELL.001.15
R1 - 15 - 전부
EGFP+: 3.265%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
EGFP+ - 15 - 전부
생존: 12.575%
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...
CD4+ 생존 - 15 - 전부
Has CRISPR: 0.665%
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP

도면106b

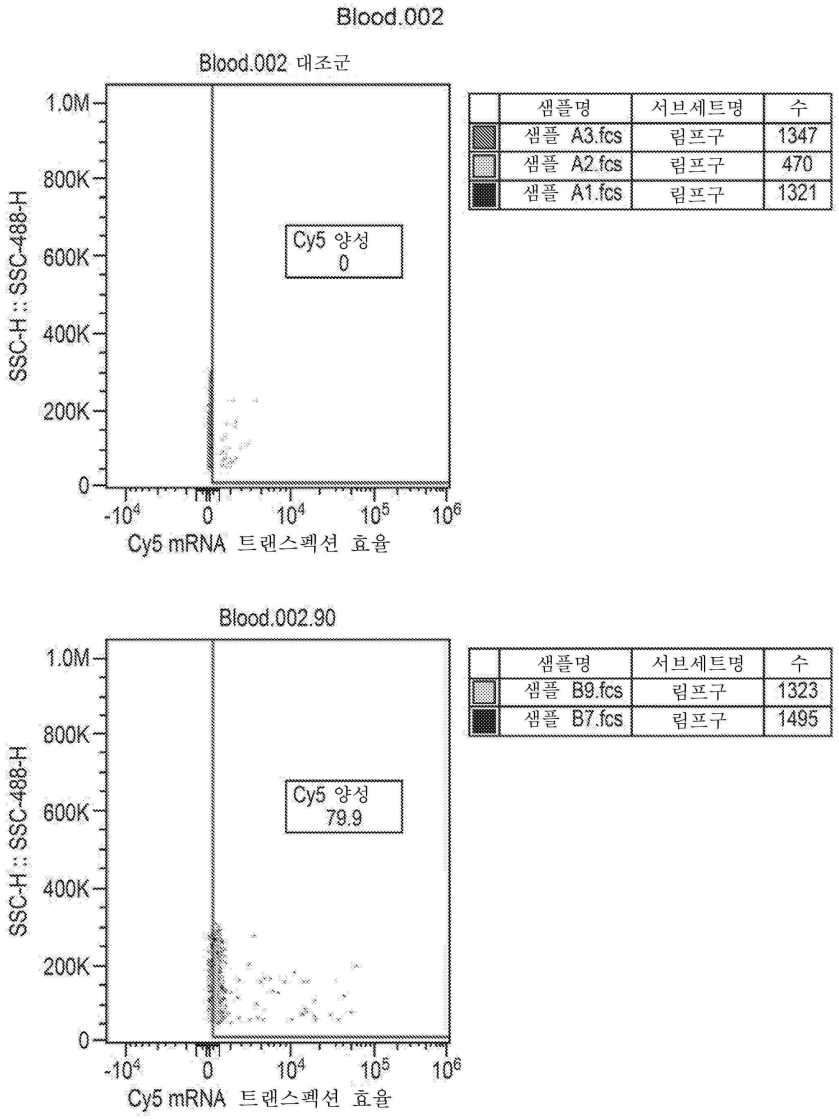

CD8a+ 생존 - 15 - 전부
100
80
60
40
20
최대의 백분율
Has CRISPR1: 0.415%
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP


R1 - 15 - 전부
100
80
60
40
20
최대의 백분율
R6: 59.824%
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

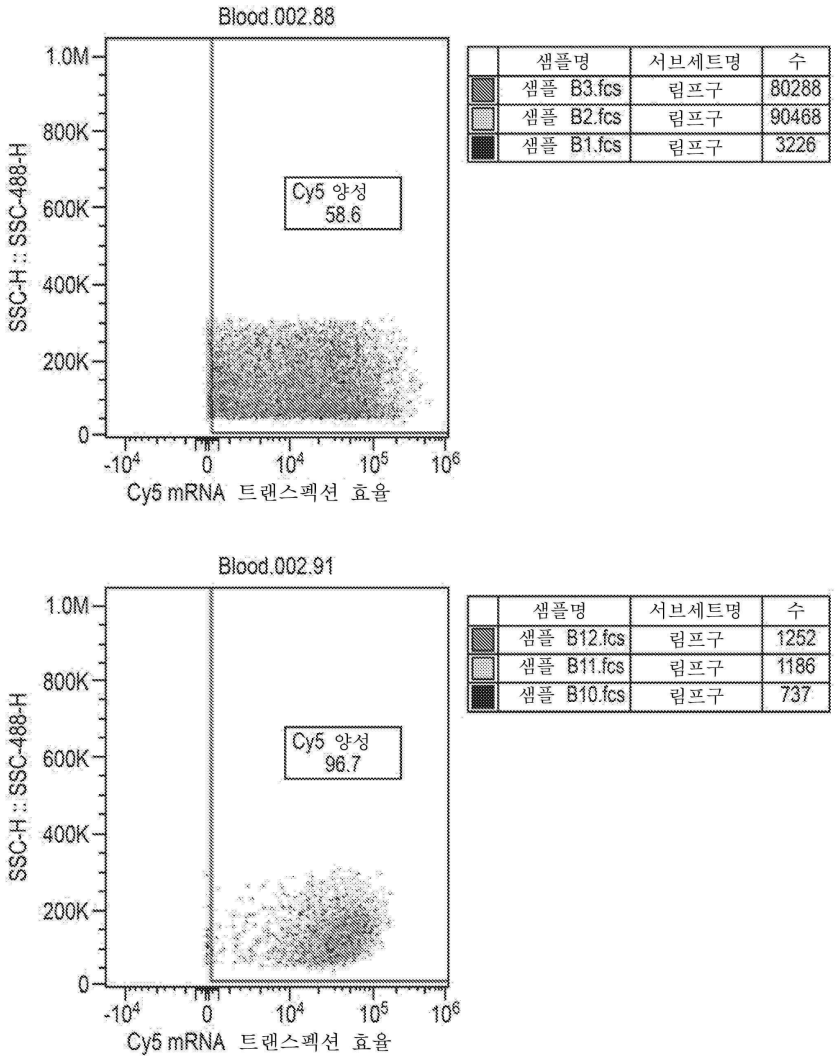
도면107


TCELL.001 음성 대조군
CD4+ 생존 - 19 - 음성
Has CRISPR: 0.261%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
CD8a+ 생존 - 19 - 음성
Has CRISPR1: 0.224%
최대의 백분율
BL1-H - EGFP - CRISPR RNP
R1 - 19 - 음성
R6: 84.662%
최대의 백분율
RL3-H - 생존능 - ZOMBIER...

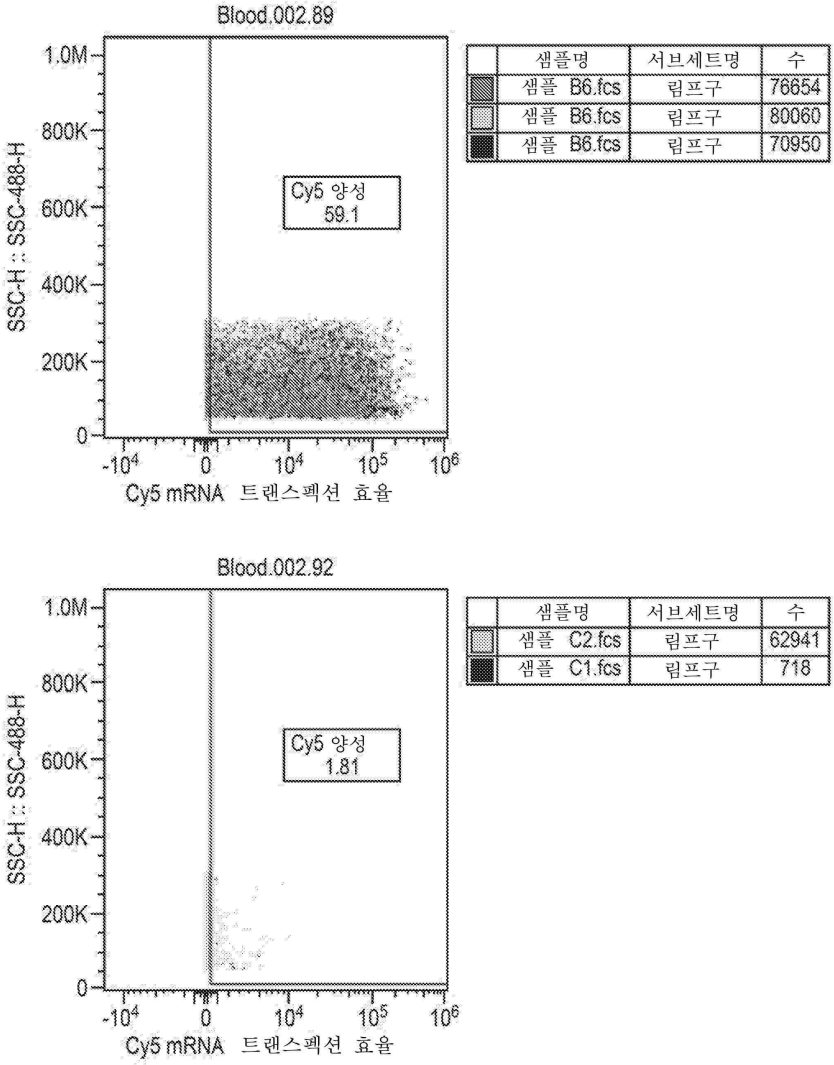
도면108a


Blood.002
Blood.002 대조군
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
SSC-H :: SSC-488-H
Cy5 양성
0
-10^4
0
10^4
10^5
10^6
Cy5 mRNA 트랜스펙션 효율
샘플명 서브세트명 수
샘플 A3.fcs 림프구 1347
샘플 A2.fcs 림프구 470
샘플 A1.fcs 림프구 1321
Blood.002.90
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
SSC-H :: SSC-488-H
Cy5 양성
79.9
-10^4
0
10^4
10^5
10^6
Cy5 mRNA 트랜스펙션 효율
샘플명 서브세트명 수
샘플 B9.fcs 림프구 1323
샘플 B7.fcs 림프구 1495

도면108b

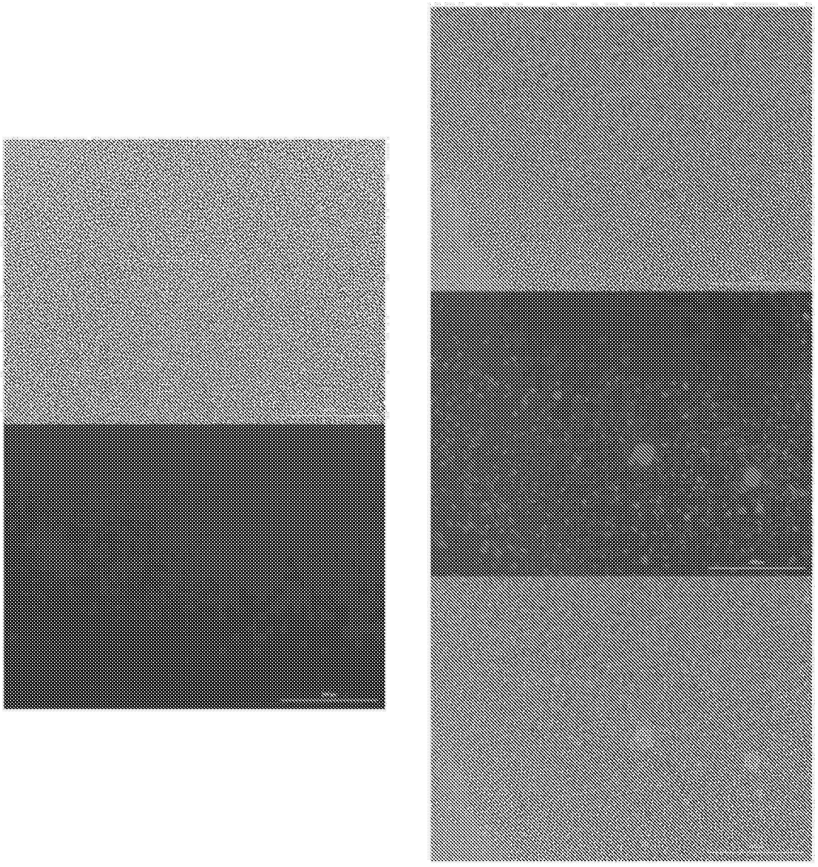

Blood.002.88
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
SSC-H :: SSC-488-H
Cy5 양성
58.6
-10^4
0
10^4
10^5
10^6
Cy5 mRNA 트랜스펙션 효율
샘플명 서브세트명 수
샘플 B3.fcs 림프구 80288
샘플 B2.fcs 림프구 90468
샘플 B1.fcs 림프구 3226
Blood.002.91
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
SSC-H :: SSC-488-H
Cy5 양성
96.7
-10^4
0
10^4
10^5
10^6
Cy5 mRNA 트랜스펙션 효율
샘플명 서브세트명 수
샘플 B12.fcs 림프구 1252
샘플 B11.fcs 림프구 1186
샘플 B10.fcs 림프구 737

도면108c

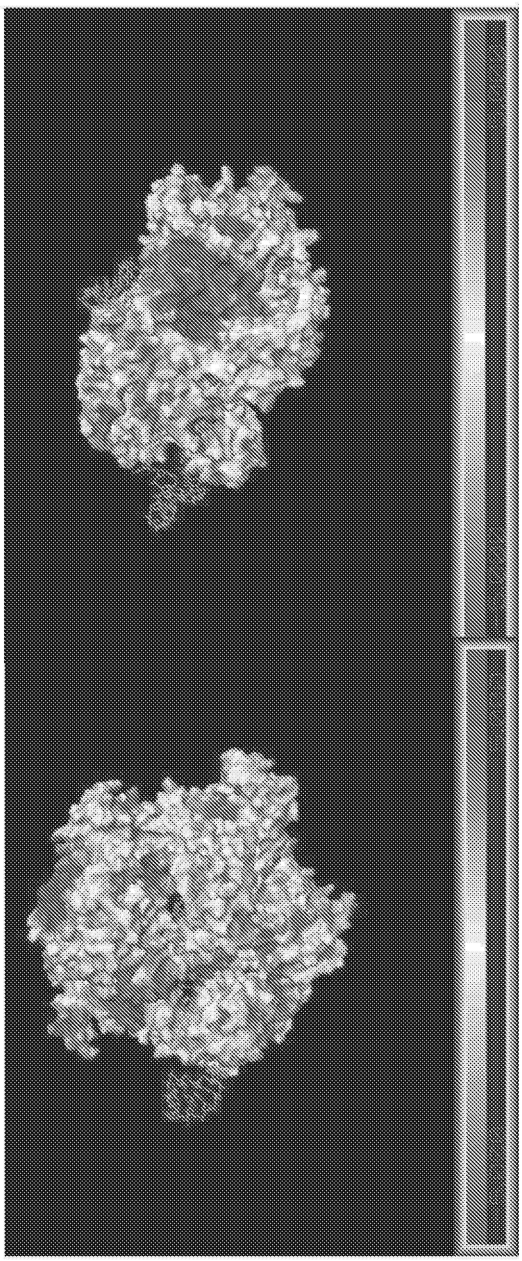

Blood.002.89
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
SSC-H :: SSC-488-H
Cy5 양성
59.1
-10^4
0
10^4
10^5
10^6
Cy5 mRNA 트랜스펙션 효율
샘플명 서브세트명 수
샘플 B6.fcs 림프구 76654
샘플 B6.fcs 림프구 80060
샘플 B6.fcs 림프구 70950
Blood.002.92
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
SSC-H :: SSC-488-H
Cy5 양성
1.81
-10^4
0
10^4
10^5
10^6
Cy5 mRNA 트랜스펙션 효율
샘플명 서브세트명 수
샘플 C2.fcs 림프구 62941
샘플 C1.fcs 림프구 718

도면109

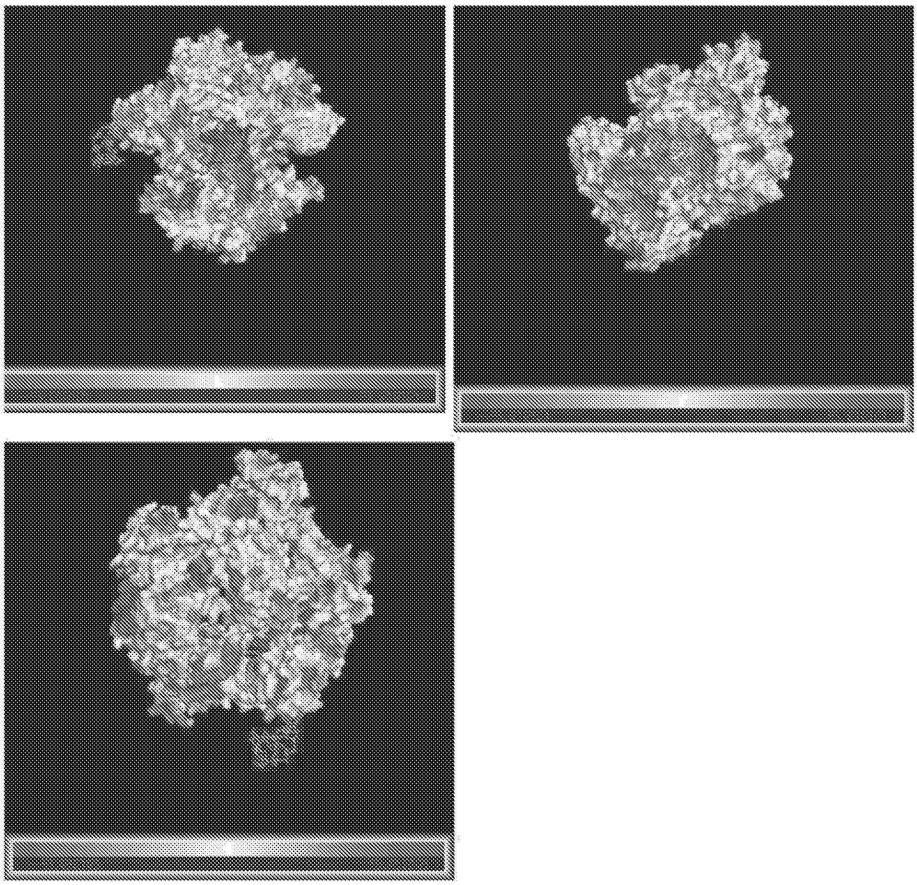
TCELL.001.27



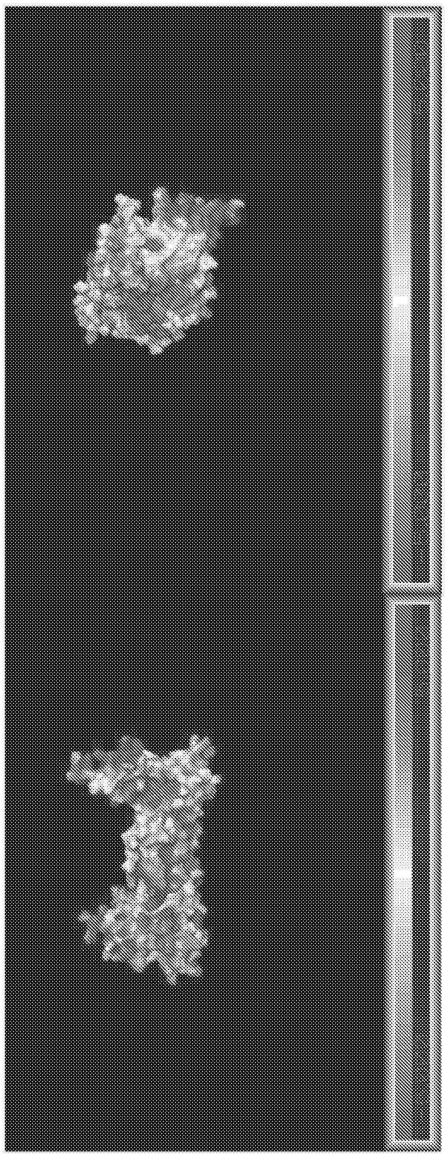
도면110a



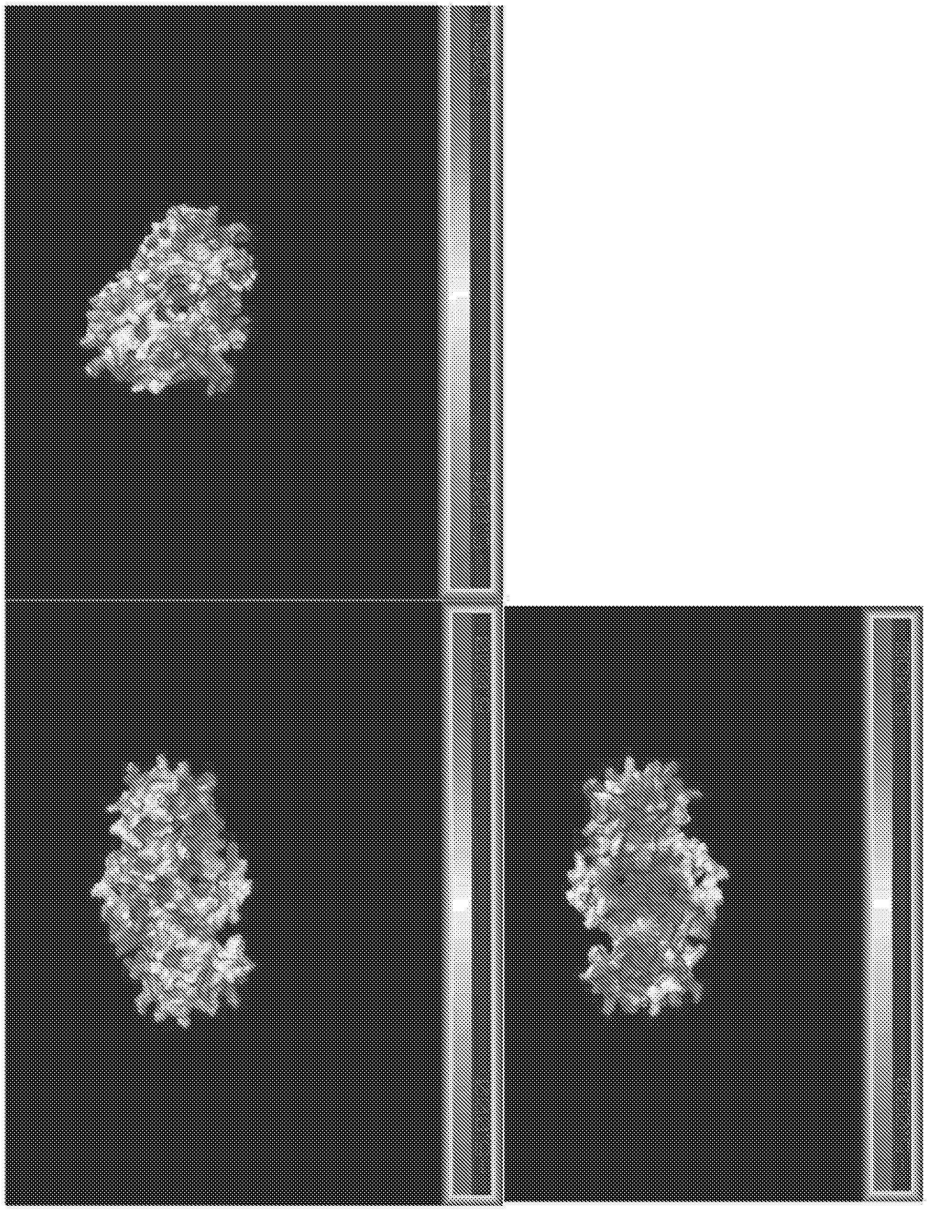
도면110b



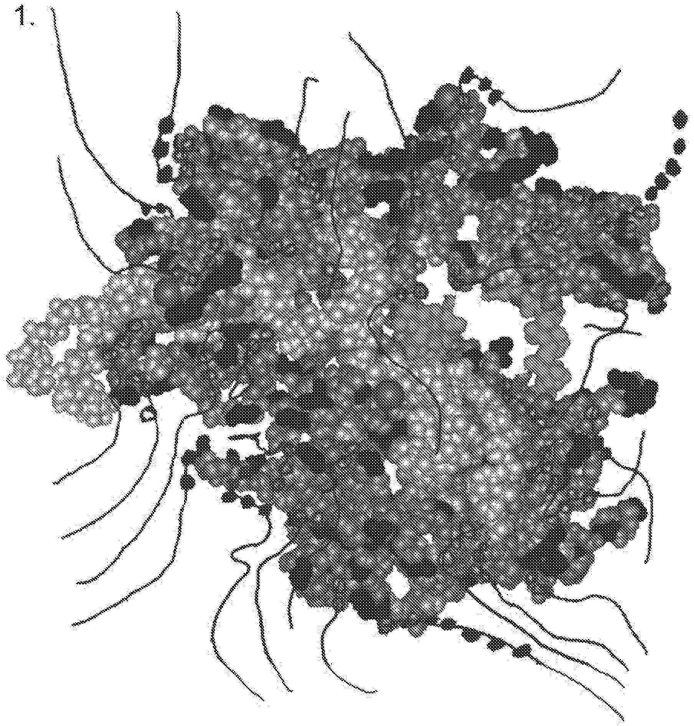
도면111a



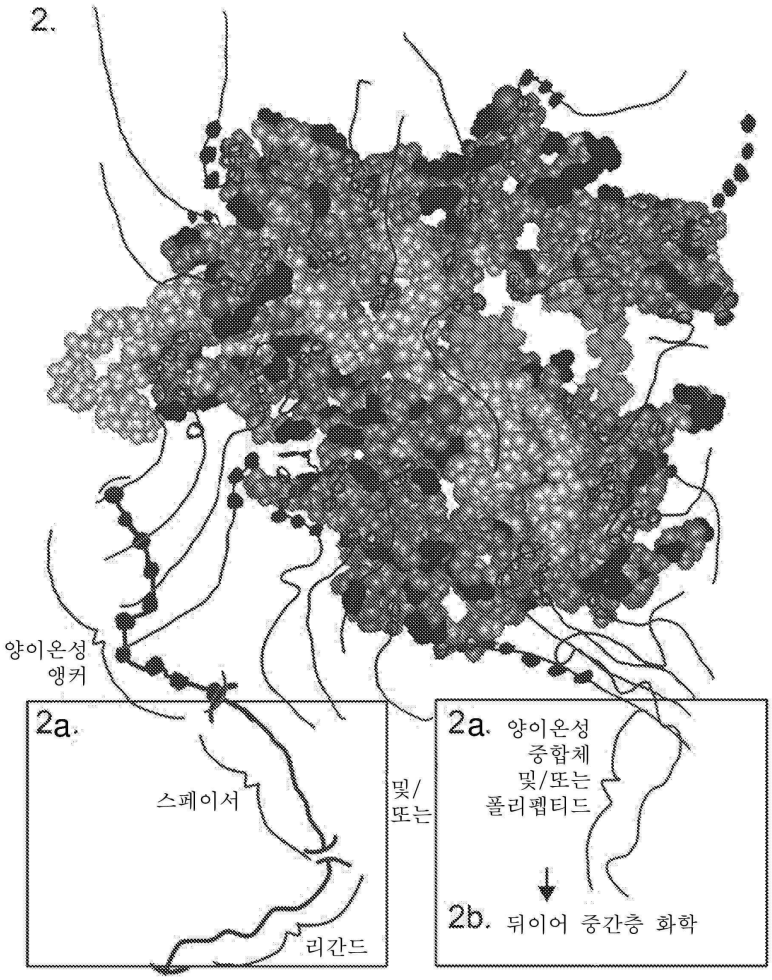
도면111b



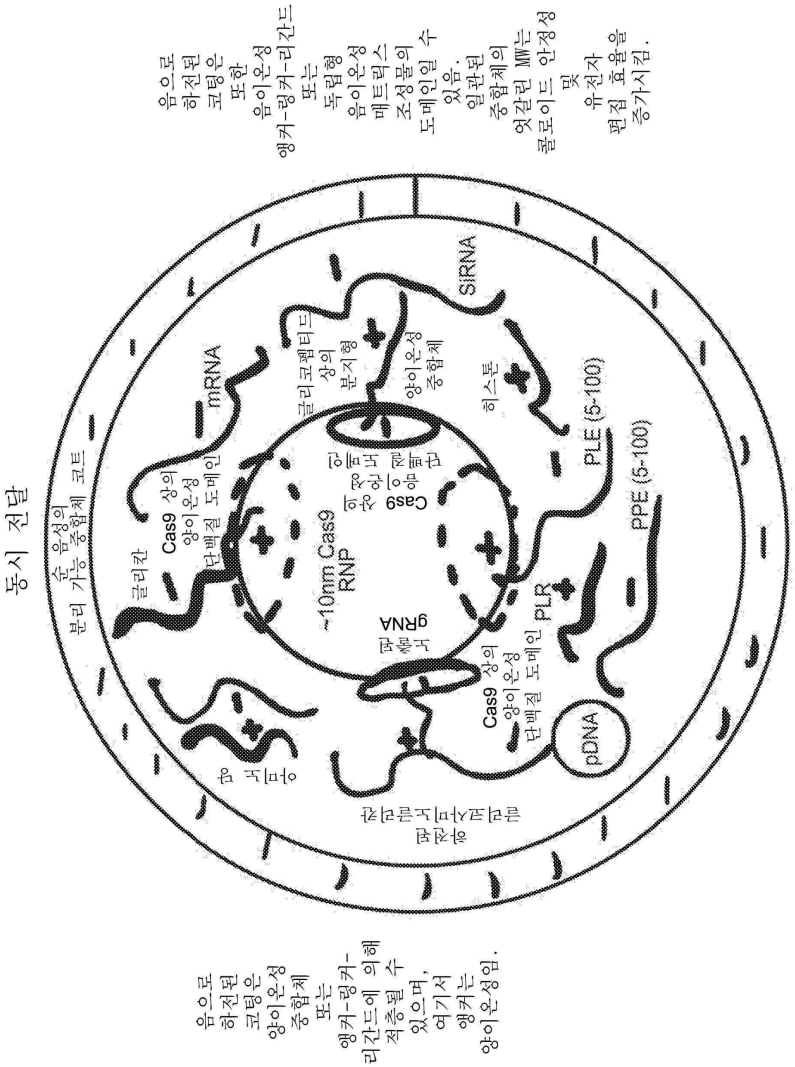
도면112a



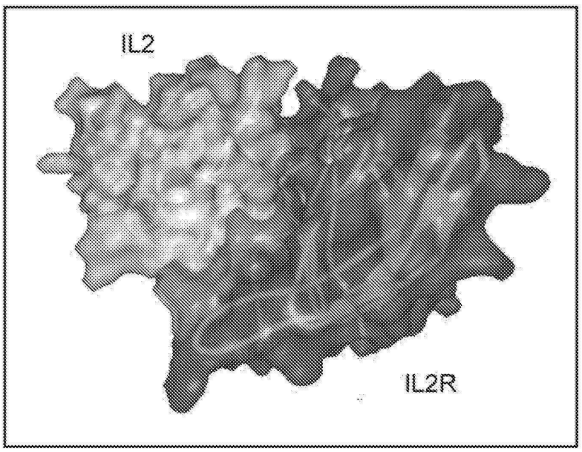
도면112b



도면113


동시 전달
분리 가능 중합체 코트
순 음성의
글리칸
Cas9 상의
양이온성
단백질 도메인
mRNA
~10mm Cas9
RNP
gRNA
글리코펩티드
상의
분지형
양이온성
중합체
SiRNA
히스톤
PLE (5-100)
PPE (5-100)
PLR
Cas9 상의
양이온성
단백질 도메인
pDNA
음으로
하전된
코팅은
또한
음이온성
엥커-링커-리간드
또는
뚜렷한
음이온성
메트릭스
조성물의
도메인일 수
있음.
일관된
중합체의
엇갈린 MW는
콜로이드 안정성
및
유전자
편집 효율을
증가시킴.
음으로
하전된
코팅은
양이온성
중합체
또는
엥커-링커-
리간드에 의해
적층될 수
있으며,
여기서
엥커는
양이온성임.

도면114a

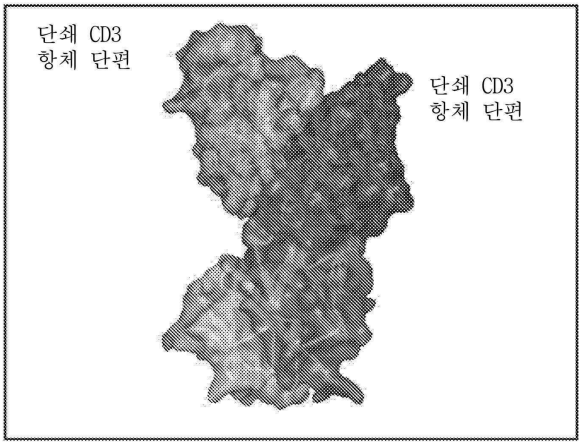


- A 20 ASP
- A 21 LEU
- A 22 GLN
- A 23 MET
- A 24 ILE
- A 25 LEU
- A 26 ASN
- A 27 GLY
- A 28 ILE
- A 29 ASN
- A 30 ASN
- A 31 TYR
- A 32 LYS
- **A 33 ASN**
- A 132 LEU
- A 135 THR
- 사슬 B: 인터류킨-2 수용체 알파 사슬
- B - 1 ASP
- B 0 PRO
- B 1 GLU
- B 2 LEU
- **B 3 CYS**
- **B 4 ASP**
- **B 5 ASP**
- **B 6 ASP**
- B 7 PRO
- B 8 PRO
- B 9 GLU

도면114b

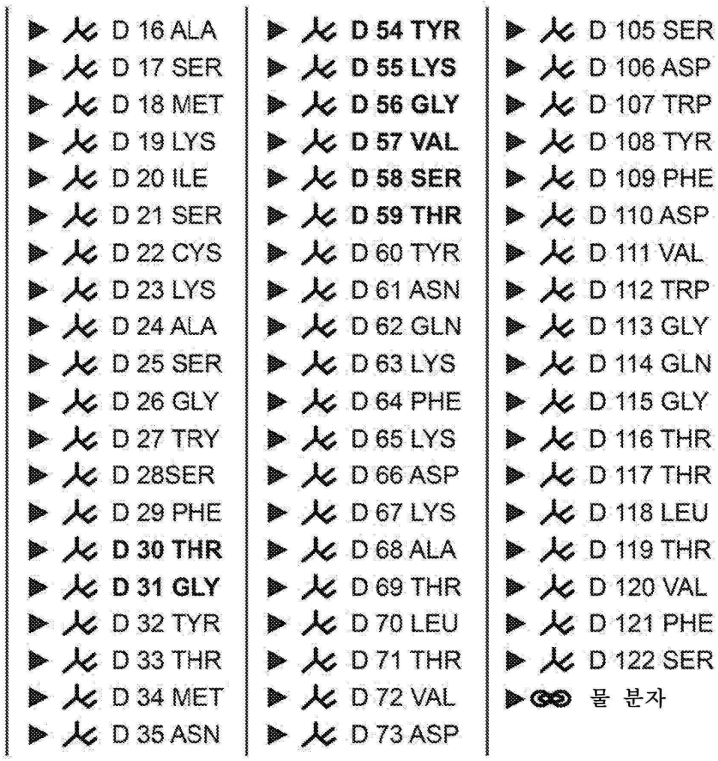

A 34 PRO
A 35 LYS
A 36 LEU
A 37 THR
A 38 ARG
A 39 MET
A 40 LEU
A 41 THR
A 42 PHE
A 43 LYS
A 44 PHE
A 45 TYR
A 46 MET
A 47 PRO
A 48 LYS
A 49 LYS
A 50 ALA
A 51 THR
A 52 GLU
A 53 LEU
B 10 ILE
B 11 PRO
B 12 HIS
B 13 ALA
B 14 THR
B 15 PHE
B 16 LYS
B 17 ALA
B 18 MET
B 19 ALA
B 20 TYR
B 21 LYS
B 22 GLU
B 23 GLY
B 24 THR
B 25 MET
B 26 LEU
B 27 ASN
B 28 CYS
B 29 GLU

도면115a

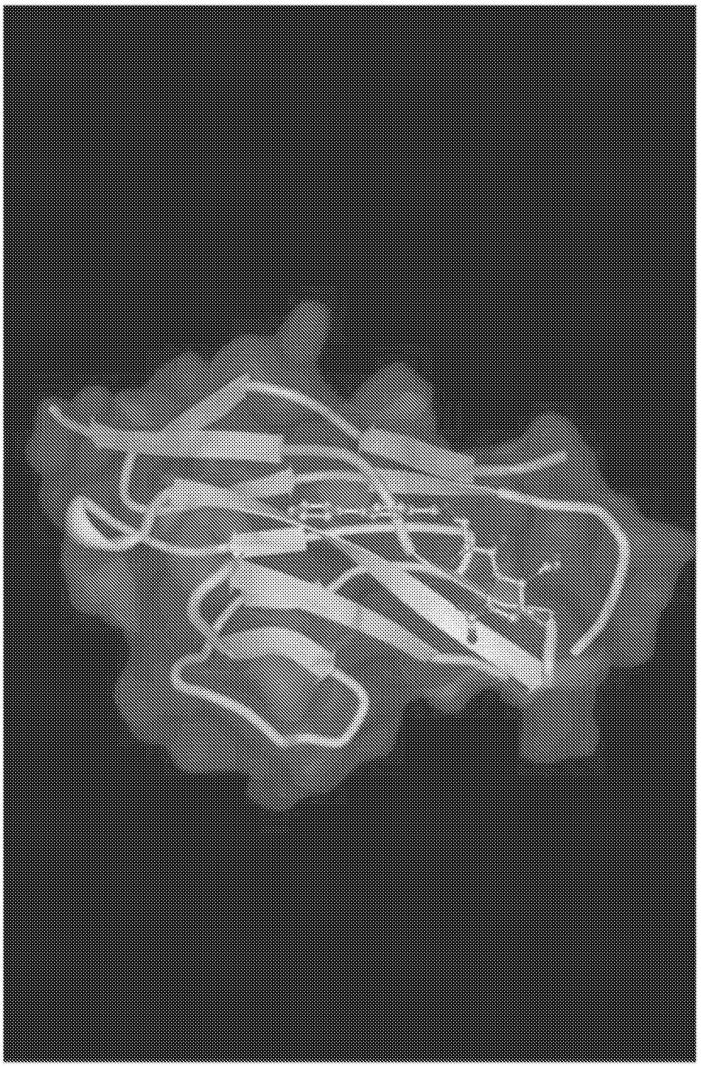


▶ 人 D 2 VAL	▶ 人 D 40 SER	▶ 人 D 91 SER
▶ 人 D 3 GLN	▶ 人 D 41 HIS	▶ 人 D 92 ALA
▶ 人 D 4 LEU	▶ 人 D 42 GLY	▶ 人 D 93 VAL
▶ 人 D 5 GLN	▶ 人 D 43 LYS	▶ 人 D 94 TYR
▶ 人 D 6 GLN	▶ 人 D 44 ASN	▶ 人 D 95 TYR
▶ 人 D 7 SER	▶ 人 D 45 LEU	▶ 人 D 96 CYS
▶ 人 D 8 GLY	▶ 人 D 46 GLU	▶ 人 D 97 ALA
▶ 人 D 9 PRO	▶ 人 D 47 TRP	▶ 人 D 98 ARG
▶ 人 D 10 GLU	▶ 人 D 48 MET	▶ 人 D 99 SER
▶ 人 D 11 LEU	▶ 人 D 49 GLY	▶ 人 D 100 GLY
▶ 人 D 12 VAL	▶ 人 D 50 LEU	▶ 人 **D 101 TYR**
▶ 人 D 13 LYS	▶ 人 D 51 ILE	▶ 人 **D 102 TYR**
▶ 人 D 14 PRO	▶ 人 **D 52 ASN**	▶ 人 **D 103 GLY**
▶ 人 D 15 CLY	▶ 人 **D 53 PRO**	▶ 人 **D 104 ASP**

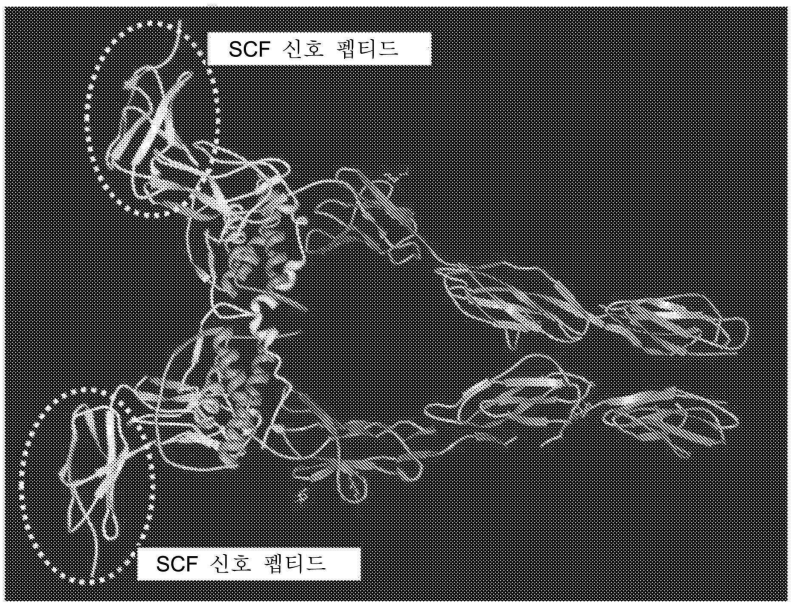
도면115b


D 16 ALA
D 17 SER
D 18 MET
D 19 LYS
D 20 ILE
D 21 SER
D 22 CYS
D 23 LYS
D 24 ALA
D 25 SER
D 26 GLY
D 27 TRY
D 28SER
D 29 PHE
D 30 THR
D 31 GLY
D 32 TYR
D 33 THR
D 34 MET
D 35 ASN
D 54 TYR
D 55 LYS
D 56 GLY
D 57 VAL
D 58 SER
D 59 THR
D 60 TYR
D 61 ASN
D 62 GLN
D 63 LYS
D 64 PHE
D 65 LYS
D 66 ASP
D 67 LYS
D 68 ALA
D 69 THR
D 70 LEU
D 71 THR
D 72 VAL
D 73 ASP
D 105 SER
D 106 ASP
D 107 TRP
D 108 TYR
D 109 PHE
D 110 ASP
D 111 VAL
D 112 TRP
D 113 GLY
D 114 GLN
D 115 GLY
D 116 THR
D 117 THR
D 118 LEU
D 119 THR
D 120 VAL
D 121 PHE
D 122 SER
물 분자

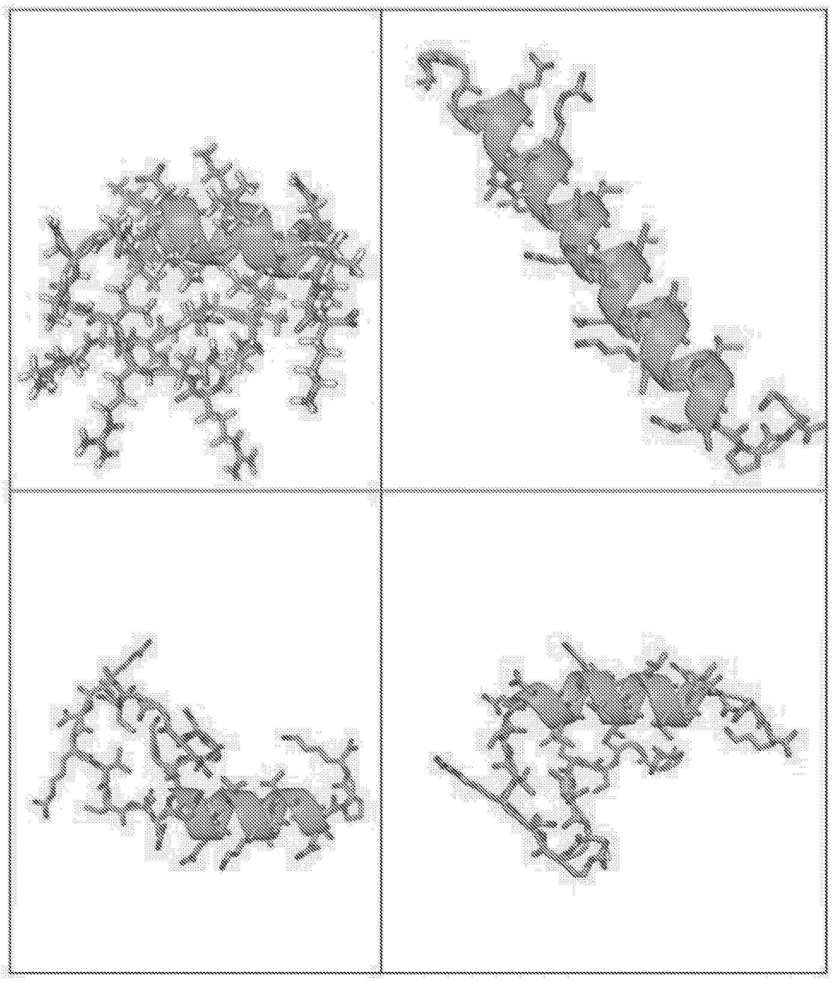
도면116



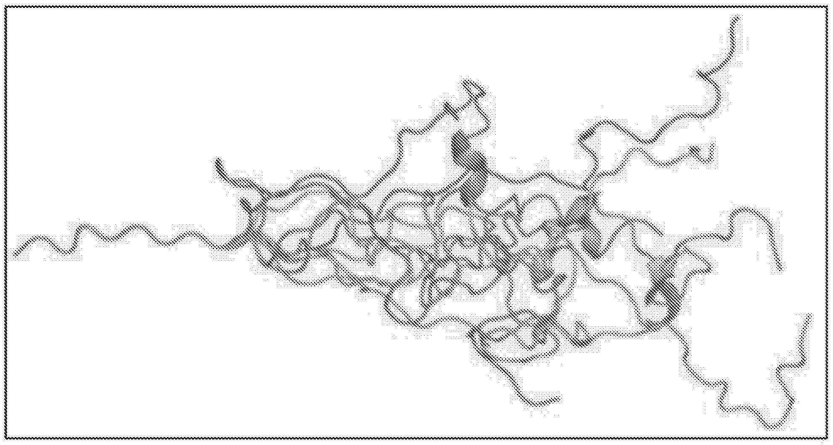
도면117

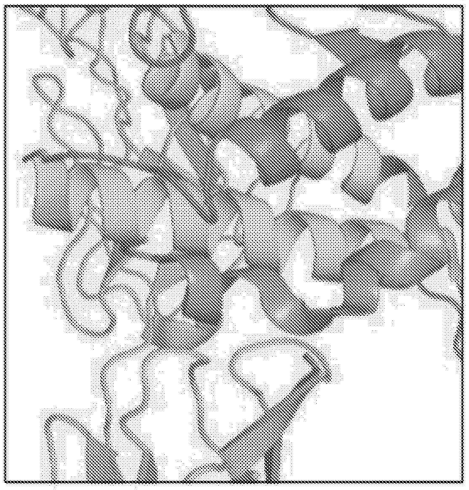


도면118

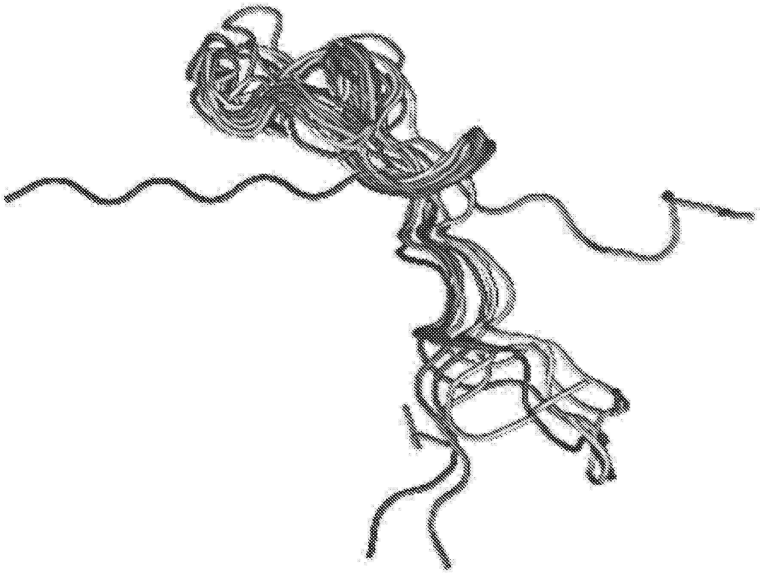


도면119





도면120



가닥이 링커 잔기와 크게 상호작용하는 구조로 수렴됨.

잔기 71 내지 94의 경우, KIT에 2개의 다른 나선과 상호작용함으로써 나선을 안정화시키는 소수성 잔기가 존재한다. 소수성 잔기는 적색 (밑줄)으로 제시된다:

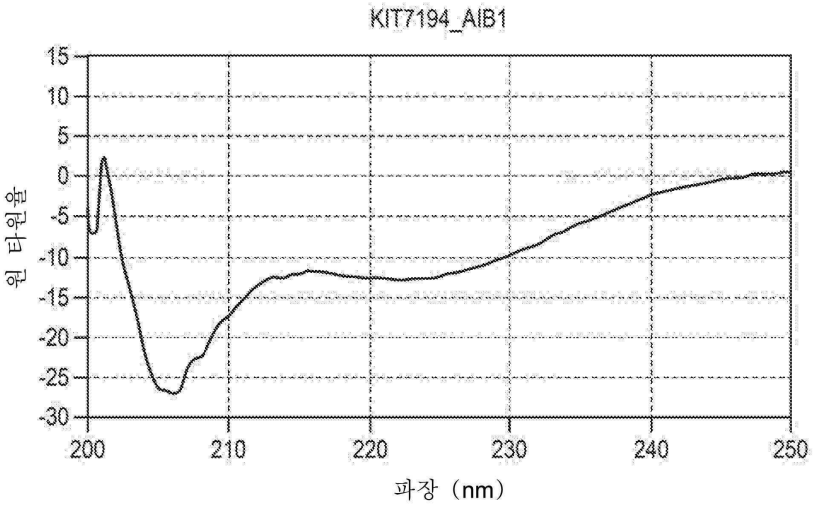
SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS

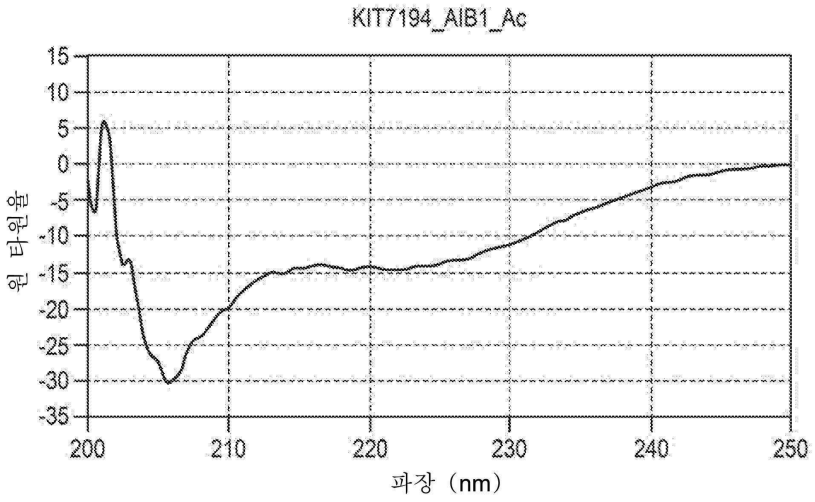
서열을 변경시켜 소수성 잔기를 제거하고, 나선형 접힘을 유도하는 것을 돕는 아미노 이소부티르산 (Aib)으로 대체함:

SNYS IIDK LVNIV DD LVECVKENS

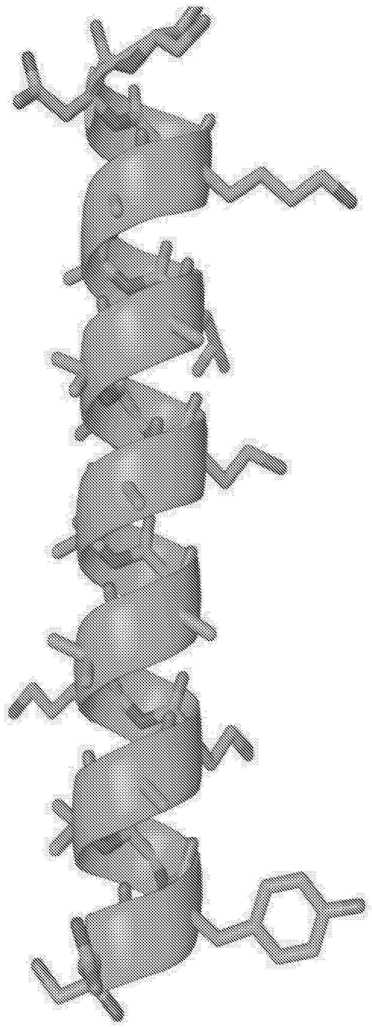
KIT7194_AIB1: SNYS AibADK AibANAibA DD AibAEAibAKENS

도면121

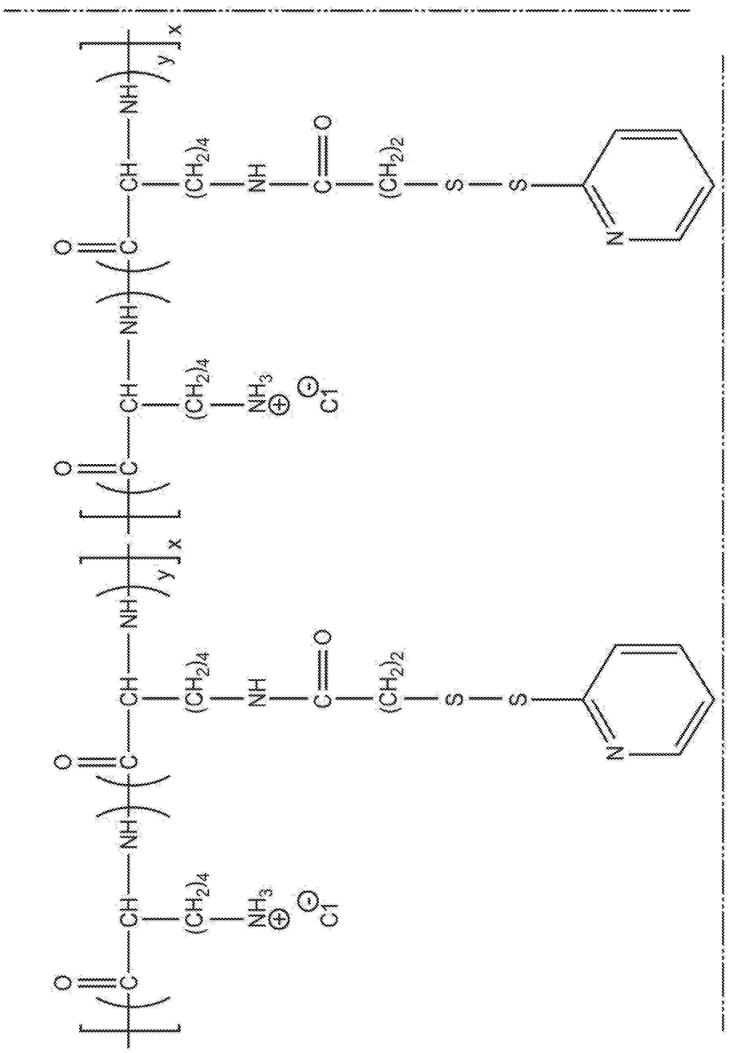

KIT7194_AIB1
원 타원율
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
200
210
220
230
240
250
파장 (nm)


KIT7194_AIB1_Ac
원 타원율
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-35
200
210
220
230
240
250
파장 (nm)

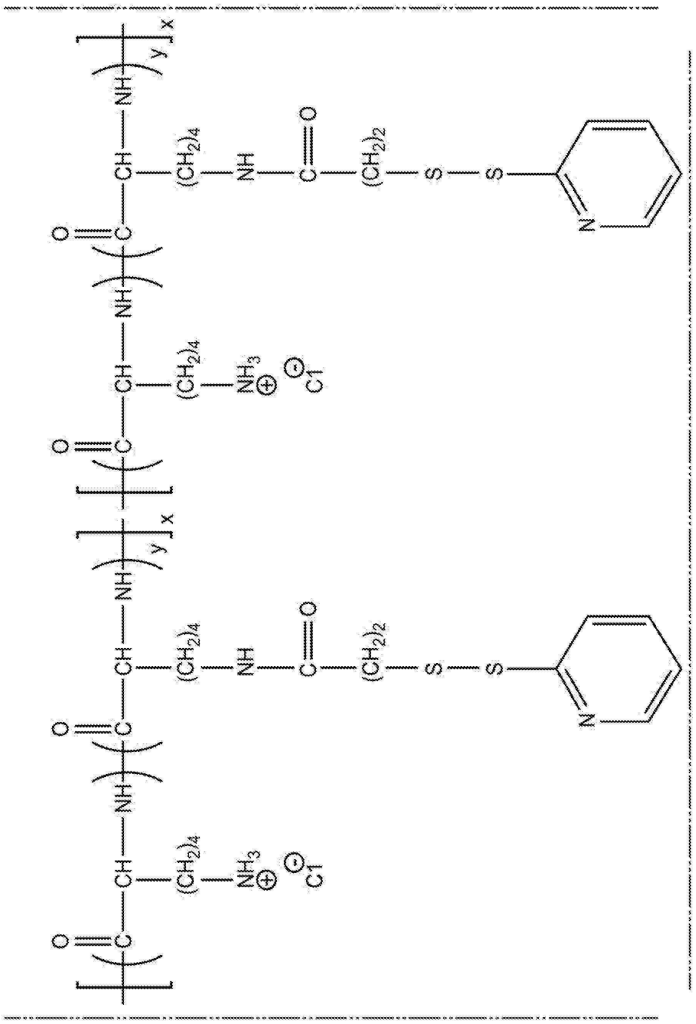
도면122



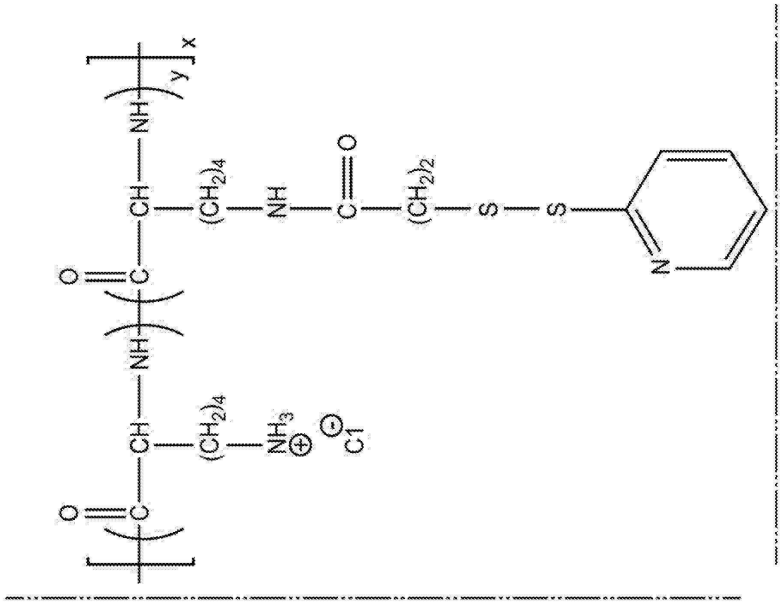
도면123a



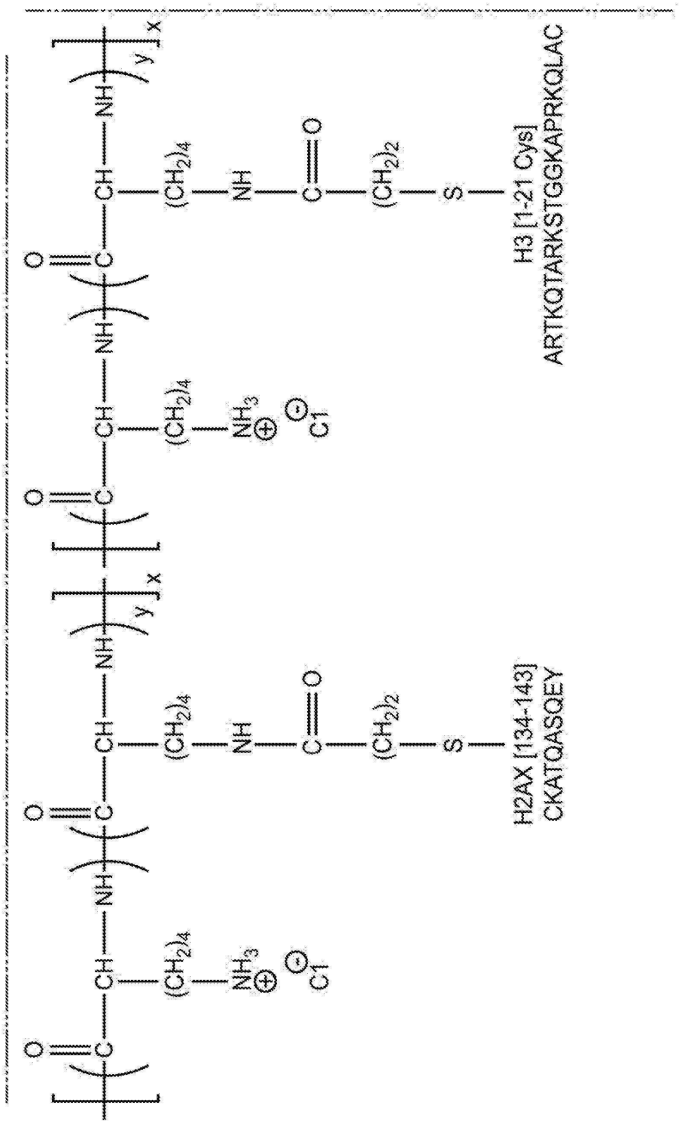
도면123b



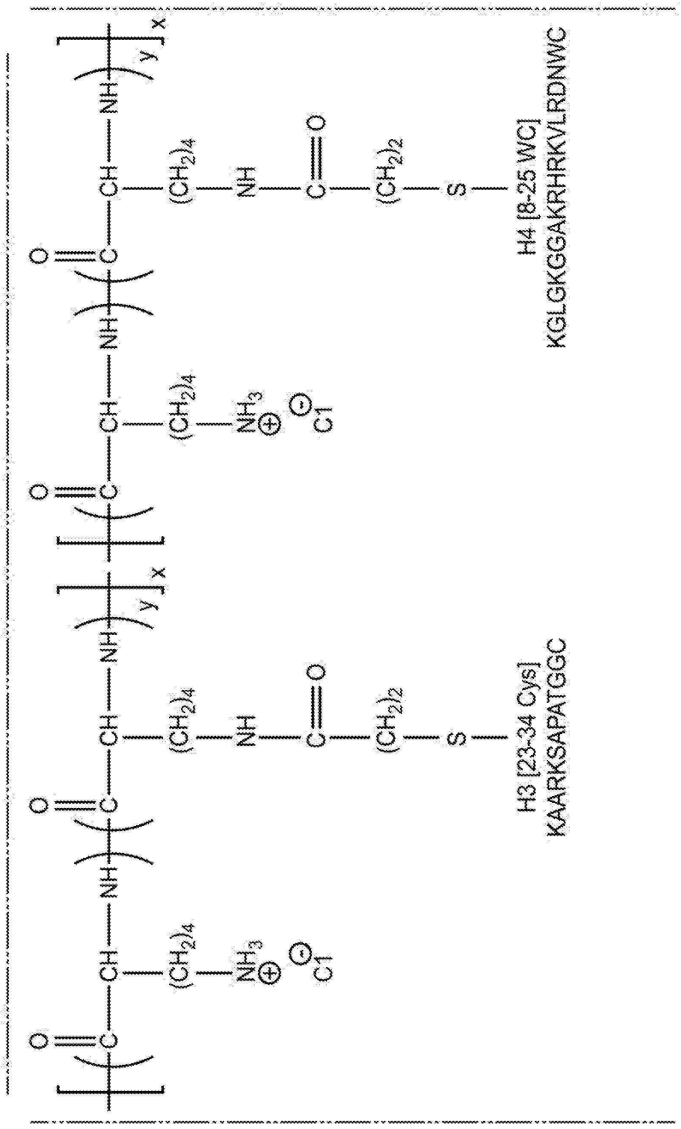
도면123c



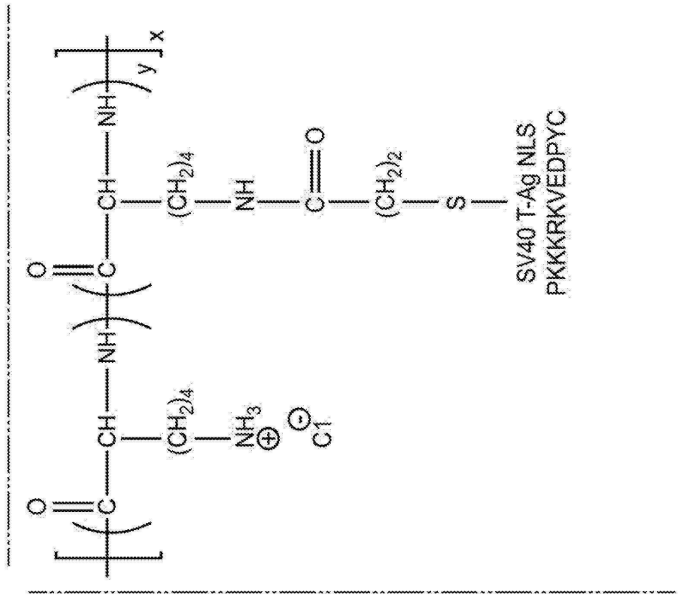
도면123d


H2AX [134-143]
CKATQASQEY
H3 [1-21 Cys]
ARTKQTARKSTGGKAPRKQLAC

도면123e


H4 [8-25 WC]
KGLGKGGAKRHRKVLRDNWC
H3 [23-34 Cys]
KAARKSAPATGGC
Cl
x
y

도면123f



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Ligandal, Inc.

Watson, Andre

Foster, Christian

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR NUCLEIC ACID AND PROTEIN PAYLOAD DELIVERY

<130> 134554.8003.WO00 (LGDL-003)

<140> PCT/US2017/066541

<141> 2017-12-14

<150> US 62/443,522

<151> 2017-01-06

<150> US 62/434,344

<151> 2016-12-14

<150> US 62/443,567

<151> 2017-01-06

<150> US 62/517,346

<151> 2017-06-09

<160> 188

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 39

<212

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exendin-4

<400> 1

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exendin (S11C)

<400> 2

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Cys Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 3

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FGF fragment

<400> 3

Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro

1 5 10 15

Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys

20 25 30

Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val

35 40 45

Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala

50 55 60

Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser

65 70 75 80

Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr

85

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> (FGF fragment

<400> 4

Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp

1 5 10 15

Gly Val Arg Glu Lys Ser

20

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FGF fragment

<400> 5

His Phe Lys Asp Pro Lys

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> FGF fragment

<400> 6

Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr

1 5

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> E-selectin

<400> 7

Met Ile Ala Ser Gln Phe Leu Ser Ala Leu Thr Leu Val Leu Leu Ile

1 5 10 15

Lys Glu Ser Gly Ala

20

<210> 8

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> L-selectin

<400> 8

Met Val Phe Pro Trp Arg Cys Glu Gly Thr Tyr Trp Gly Ser Arg Asn

1 5 10 15

Ile Leu Lys Leu Trp Val Trp Thr Leu Leu Cys Cys Asp Phe Leu Ile

20 25 30

His His Gly Thr His Cys

35

<210> 9

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> L-selectin

<400> 9

Met Ile Phe Pro Trp Lys Cys Gln Ser Thr Gln Arg Asp Leu Trp Asn

1 5 10 15

Ile Phe Lys Leu Trp Gly Trp Thr Met Leu Cys Cys Asp Phe Leu Ala

20 25 30

His His Gly Thr Asp Cys

35

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> L-selectin

<400> 10

Met Ile Phe Pro Trp Lys Cys Gln Ser Thr Gln Arg Asp Leu Trp Asn

1 5 10 15

Ile Phe Lys Leu Trp Gly Trp Thr Met Leu Cys Cys

20 25

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Transferrin ligand

<400> 11

Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro

1 5 10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> a5b1 ligand

<400> 12

Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala

1 5

<210> 13

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 13

Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro
1 5 10 15

Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys
20 25 30
Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val
35 40 45
Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala
50 55 60
Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser
65 70 75 80

Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr
85

<210> 14

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 14

Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val
1 5 10 15
Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser
20

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Anchoring domain

<400> 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Anchoring domain

<400> 16

His His His His His His

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 17

Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro

1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 18

Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Cys

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 19

Cys Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro

1 5 10

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 20

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 21

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 22

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 23

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 24

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 25

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 26

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 27

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 28

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 29

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Cys

1 5 10

<210> 32

<211

> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 32

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 33

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys

1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 34

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 35

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 35

Lys Ala Leu Ala

1

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 36

Gly Ala Leu Ala

1

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 37

Cys Lys Ala Leu Ala

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 38

Lys Ala Leu Ala Cys

1 5

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 39

Cys Gly Ala Leu Ala

1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 40

Gly Ala Leu Ala Cys

1 5

<210> 41

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Cysteine conjugation anchor 1 (CCA1)

<400> 41

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala Pro Cys

<210> 42

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Cysteine conjugation anchor 2 (CCA2)

<400> 42

Cys Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg Arg

<210> 43

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 43

Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val

1 5 10 15

Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser

20

<210> 44

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 44

Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp

1 5 10 15

Gly Val Arg Glu Lys Ser Cys

20

<210> 45

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> alpha5beta1 ligand

<400> 45

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala Pro Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala

20 25

<210> 46

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> alpha5beta1 ligand

<400> 46

Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro

1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

20 25

<210> 47

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> RGD alpha5beta1 ligand

<400> 47

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala Pro Arg Gly Asp

20

<210> 48

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> RGD alpha5beta1 ligand

<400> 48

Arg Gly Asp Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg

20

<210> 49

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> RGD ligand - Cys left

<400> 49

Cys Arg Gly Asp

1

<210> 50

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> RGD ligand - Cys right

<400> 50

Arg Gly Asp Cys

1

<210> 51

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Transferrin ligand

<400> 51

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala Pro Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro

20 25 30

<210> 52

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Transferrin ligand

<400> 52

Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro Gly Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala Pro Gly Ala Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

20 25 30

<210> 53

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Transferrin ligand - Cys left

<400> 53

Cys Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro

1 5 10

<210> 54

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Transferrin ligand - Cys left

<400> 54

Cys Pro Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro

1 5 10

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Transferrin ligand - Cys right

<400> 55

Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro Cys
1 5 10

<210> 56

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> E-selectin ligand [1-21]

<400> 56

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly
1 5 10 15

Ala Pro Met Ile Ala Ser Gln Phe Leu Ser Ala Leu Thr Leu Val Leu
20 25 30

Leu Ile Lys Glu Ser Gly Ala
35

<210> 57

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> E-selectin ligand [1-21]

<400> 57

Met Ile Ala Ser Gln Phe Leu Ser Ala Leu Thr Leu Val Leu Leu Ile
1 5 10 15

Lys Glu Ser Gly Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
35

<210> 58

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> E-selectin ligand [1-21] - Cys left

<400> 58

Cys Met Ile Ala Ser Gln Phe Leu Ser Ala Leu Thr Leu Val Leu Leu

1 5 10 15

Ile Lys Glu Ser Gly Ala

20

<210> 59

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> E-selectin ligand [1-21] - Cys right

<400> 59

Met Ile Ala Ser Gln Phe Leu Ser Ala Leu Thr Leu Val Leu Leu Ile

1 5 10 15

Lys Glu Ser Gly Ala Cys

20

<210> 60

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FGF fragment [26-47]

<400> 60

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala Pro Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg

20 25 30

Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser

35 40

<210> 61

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FGF fragment [26-47]

<400> 61

Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp
1 5 10 15
Gly Val Arg Glu Lys Ser Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Arg
20 25 30
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
35 40

<210> 62
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> H2A [1-20]

<400> 62
Ser Gly Arg Gly Lys Gln Gly Gly Lys Ala Arg Ala Lys Ala Lys Thr
1 5 10 15
Arg Ser Ser Arg
20

<210> 63
<211> 39
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> H2A [1-39]
<400> 63
Ser Gly Arg Gly Lys Gln Gly Gly Lys Ala Arg Ala Lys Ala Lys Thr
1 5 10 15
Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His Arg
20 25 30

Leu Leu Arg Lys Gly Gly Gly
35

<210> 64
<211> 130
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> H2A [1-130]

<400> 64

Met Ser Gly Arg Gly Lys Gln Gly Gly Lys Ala Arg Ala Lys Ala Lys
1 5 10 15

Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
20 25 30

Arg Leu Leu Arg Lys Gly Asn Tyr Ala Glu Arg Val Gly Ala Gly Ala
35 40 45

Pro Val Tyr Leu Ala Ala Val Leu Glu Tyr Leu Thr Ala Glu Ile Leu
50 55 60

Glu Leu Ala Gly Asn Ala Ala Arg Asp Asn Lys Lys Thr Arg Ile Ile
65 70 75 80

Pro Arg His Leu Gln Leu Ala Ile Arg Asn Asp Glu Glu Leu Asn Lys
85 90 95

Leu Leu Gly Lys Val Thr Ile Ala Gln Gly Gly Val Leu Pro Asn Ile
100 105 110

Gln Ala Val Leu Leu Pro Lys Lys Thr Glu Ser His His Lys Ala Lys
115 120 125

Gly Lys
130

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H2AX [134-143]

<400> 65

Cys Lys Ala Thr Gln Ala Ser Gln Glu Tyr
1 5 10

<210> 66

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H2AX [120-129]

<400> 66

Lys Lys Thr Ser Ala Thr Val Gly Pro Lys Ala Pro Ser Gly Gly Lys

1 5 10 15

Lys Ala Thr Gln Ala Ser Gln Glu Tyr

20 25

<210> 67

<211> 143

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H2AX [1-143]

<400> 67

Met Ser Gly Arg Gly Lys Thr Gly Gly Lys Ala Arg Ala Lys Ala Lys

1 5 10 15

Ser Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His

20 25 30

Arg Leu Leu Arg Lys Gly His Tyr Ala Glu Arg Val Gly Ala Gly Ala

35 40 45

Pro Val Tyr Leu Ala Ala Val Leu Glu Tyr Leu Thr Ala Glu Ile Leu

50 55 60

Glu Leu Ala Gly Asn Ala Ala Arg Asp Asn Lys Lys Thr Arg Ile Ile

65 70 75 80

Pro Arg His Leu Gln Leu Ala Ile Arg Asn Asp Glu Glu Leu Asn Lys

85 90 95

Leu Leu Gly Gly Val Thr Ile Ala Gln Gly Gly Val Leu Pro Asn Ile

100 105 110

Gln Ala Val Leu Leu Pro Lys Lys Thr Ser Ala Thr Val Gly Pro Lys

115 120 125

Ala Pro Ser Gly Gly Lys Lys Ala Thr Gln Ala Ser Gln Glu Tyr

130 135 140

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H2BK5(cr) [1-11]

<220><221> MOD_RES

<222

> (5)..(5)

<223> K(cr)

<400> 68

Pro Glu Pro Ala Lys Ser Ala Pro Ala Pro Lys

1 5 10

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H2B [1-11]

<400> 69

Pro Glu Pro Ala Lys Ser Ala Pro Ala Pro Lys

1 5 10

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H2B [21-35]

<400> 70

Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys Glu

1 5 10 15

<210> 71

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H2B [1-126]

<400> 71

Met Pro Glu Pro Ala Lys Ser Ala Pro Ala Pro Lys Lys Gly Ser Lys

1 5 10 15

Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg

20 25 30

Ser Arg Lys Glu Ser Tyr Ser Ile Tyr Val Tyr Lys Val Leu Lys Gln

35 40 45

Val His Pro Asp Thr Gly Ile Ser Ser Lys Ala Met Gly Ile Met Asn

50 55 60

Ser Phe Val Asn Asp Ile Phe Glu Arg Ile Ala Gly Glu Ala Ser Arg

65 70 75 80

Leu Ala His Tyr Asn Lys Arg Ser Thr Ile Thr Ser Arg Glu Ile Gln

85 90 95

Thr Ala Val Arg Leu Leu Leu Pro Gly Glu Leu Ala Lys His Ala Val

100 105 110

Ser Glu Gly Thr Lys Ala Val Thr Lys Tyr Thr Ser Ser Lys

115 120 125

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [1-8]

<400> 72

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg

1 5

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K4(Me1) [1-10]

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> K(Me1)

<400> 73

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser

1 5 10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K4(Me2) [1-10]

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> K(Me2)

<400> 74

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser

1 5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K4(Me3) [1-10]

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> K(Me3)

<400> 75

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser

1 5 10

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3pS10

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 76

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala

1 5 10 15

<210> 77

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [1-18] WC amide

<220><221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> AMIDATION

<400> 77

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Trp Cys

20

<210> 78

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K14(Ac) [1-19]

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> ACETYLATION

<400> 78

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln

<210> 79

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [1-20]

<400> 79

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu

20

<210> 80

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K9(Ac) [1-20]

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> ACETYLATION

<400> 80

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu

20

<210> 81

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> H3 [1-21]

<400> 81

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala

20

<210> 82

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K9(Ac) [1-21]

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> ACETYLATION

<400> 82

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala

20

<210> 83

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K9(Me1) [1-21]

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> K(Me1)

<400> 83

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala

20

<210> 84

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K9(Me2) [1-21]

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> K(Me2)

<400> 84

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala

20

<210> 85

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K9(Me3) [1-21]

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> K(Me3)

<400> 85

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala

20

<210> 86

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K4(Me1) [1-21]

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> K(Me1)

<400> 86

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala

20

<210> 87

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K4(Me2) [1-21]

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> K(Me2)

<400> 87

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala

20

<210> 88

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K4(Me3) [1-21]

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> K(Me3)

<400> 88

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala

20

<210> 89

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K9(Ac), pS10 [1-21]

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> ACETYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 89

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala

20

<210> 90

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K4(Me3), K9(Ac), pS10 [1-21]

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> K(Me3)

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> ACETYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 90

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala

20

<210> 91

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [1-21 Cys]

<400> 91

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Cys

20

<210> 92

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K9(Ac) [1-24]

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> ACETYLATION

<400> 92

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala

20

<210> 93

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K9(Me3) [1-24]

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> K(Me3)

<400> 93

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala

20

<210> 94

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [1-25 Cys]

<400> 94

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala

20 25

<210> 95

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K4(Me3) [1-25]

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> K(Me3)

<400> 95

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala

20 25

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K9(Me1) [3-17]

<220

><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> K(Me1)

<400> 96

Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro Arg

1 5 10 15

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K9(Me2) [3-17]

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> K(Me2)

<400> 97

Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro Arg

1 5 10 15

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K9(Me3) [3-17]

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> K(Me3)

<400> 98

Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro Arg

1 5 10 15

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K14(Ac) [9-19]

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> ACETYLATION

<400> 99

Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro Arg Lys Gln

1 5 10

<210> 100

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [5-23]

<400> 100

Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro Arg Lys Gln Leu

1 5 10 15

Ala Ser Lys

<210> 101

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [15-39]

<400> 101

Ala Pro Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro

1 5 10 15

Ala Thr Gly Gly Val Lys Lys Pro His

20 25

<210> 102

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [21-44]

<400> 102

Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly Val Lys

1 5 10 15

Lys Pro His Arg Tyr Arg Pro Gly

20

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [23-31]

<400> 103

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala

1 5

<210> 104

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [23-34]

<400> 104

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly

1 5 10

<210> 105

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [23-34 Cys]

<400> 105

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly Cys

1 5 10

<210> 106

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K27(Ac) [23-34]

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> ACETYLATION

<400> 106

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly

1 5 10

<210> 107

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K27(Me1) [23-34]

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> K(Me1)

<400> 107

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly

1 5 10

<210> 108

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<

220><223> H3K27(Me2) [23-34]

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> K(Me2)

<400> 108

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly

1 5 10

<210> 109

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K27(Me3) [23-34]

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> K(Me3)

<400> 109

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly

1 5 10

<210> 110

<211> 24

<212> PRT

<213

> Artificial sequence

<220><223> H3K23(Ac) [21-44]

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> ACETYLATION

<400> 110

Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly Val Lys

1 5 10 15

Lys Pro His Arg Tyr Arg Pro Gly

20

<210> 111

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3pS28 [21-44]

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 111

Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly Val Lys

1 5 10 15

Lys Pro His Arg Tyr Arg Pro Gly

20

<210> 112

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [1-35]

<400> 112

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr

20 25 30

Gly Gly Val

35

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K36(Me1) [31-41]

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> K(Me1)

<400> 113

Ser Thr Gly Gly Val Lys Lys Pro His Arg Tyr

1 5 10

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K36(Me2) [31-41]

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> K(Me2)

<400> 114

Ser Thr Gly Gly Val Lys Lys Pro His Arg Tyr

1 5 10

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K36(Me3) [31-41]

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> K(Me3)

<400> 115

Ser Thr Gly Gly Val Lys Lys Pro His Arg Tyr

1 5 10

<210> 116

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K56(Ac) [44-63]

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> ACETYLATION

<400> 116

Gly Thr Val Ala Leu Arg Glu Ile Arg Arg Tyr Gln Lys Ser Thr Glu

1 5 10 15

Leu Leu Ile Arg
20

<210> 117

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [1-50]

<400> 117

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr
20 25 30

Gly Gly Val Lys Lys Pro His Arg Tyr Arg Pro Gly Thr Val Ala Leu
35 40 45

Arg Glu
50

<210> 118

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K79(Me1)

<220><221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> K(Me1)

<400> 118

Thr Glu Leu Leu Ile Arg Lys Leu Pro Phe Gln Arg Leu Val Arg Glu
1 5 10 15

Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg Phe Gln Ser Ala Ala Ile
20 25 30

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [73-83]

<400> 119

Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg

1 5 10

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K79(Ac) [73-83]

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> ACETYLATION

<400> 120

Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg

1 5 10

<210> 121

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K79(Me3) [73-83]

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> K(Me3)

<400> 121

Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg

1 5 10

<210> 122

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [69-89]

<400> 122

Arg Leu Val Arg Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg Phe

1 5 10 15

Gln Ser Ser Ala Val

20

<210> 123

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K79(Me1) [69-89]

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> K(Me1)

<400> 123

Arg Leu Val Arg Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg Phe

1 5 10 15

Gln Ser Ser Ala Val

20

<210> 124

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K79(Me3) [69-89]

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> K(Me2)

<400> 124

Arg Leu Val Arg Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg Phe

1 5 10 15

Gln Ser Ser Ala Val

20

<210> 125

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3K79(Me3) [69-89]

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> K(Me3)

<400> 125

Arg Leu Val Arg Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg Phe

1 5 10 15

Gln Ser Ser Ala Val

20

<210> 126

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [116-136]

<400> 126

Lys Arg Val Thr Ile Met Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Arg Arg Ile

1 5 10 15

Arg Gly Glu Arg Ala

20

<210> 127

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [1-136]

<400> 127

Met Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala

1 5 10 15

Pro Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Val Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala

20 25 30

Thr Gly Gly Val Lys Lys Pro His Arg Tyr Arg Pro Gly Thr Val Ala

35 40 45

Leu Arg Glu Ile Arg Arg Tyr Gln Lys Ser Thr Glu Leu Leu Ile Arg

50 55 60

Lys Leu Pro Phe Gln Arg Leu Met Arg Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys

65 70 75 80

Thr Asp Leu Arg Phe Gln Ser Ser Ala Val Met Ala Leu Gln Glu Ala

85 90 95

Cys Glu Ser Tyr Leu Val Gly Leu Phe Glu Asp Thr Asn Leu Cys Val

100 105 110

Ile His Ala Lys Arg Val Thr Ile Met Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala

115 120 125

Arg Arg Ile Arg Gly Glu Arg Ala

130 135

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H4 [1-7]

<400> 128

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly

1 5

<210> 129

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H4 [4-12]

<400> 129

Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Ala

1 5 10

<210> 130

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H4 [1-21]

<400> 130

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys Val

20

<210> 131

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H4 [8-25 WC, amide]

<220><221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> AMIDATION

<400> 131

Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg

1 5 10 15

Asp Asn Trp Cys

20

<210> 132

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H4K5,8,12,16(Ac) [1-25]

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> ACETYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> ACETYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> ACETYLATION

<

220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> ACETYLATION

<400> 132

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys Val Leu Arg Asp Asn Gly Ser Gly Ser Lys

20 25 30

<210> 133

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H4 [1-20]

<220><221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> AMIDATION

<400> 133

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys

20

<210> 134

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H4K5(Ac) [1-20]

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> ACETYLATION

<400> 134

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys

20

<210> 135

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<

220><223> H4K8(Ac) [1-20]

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> ACETYLATION

<400> 135

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys

20

<210> 136

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H4K12(Ac) [1-20]

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> ACETYLATION

<400> 136

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys

20

<210> 137

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H4K16(Ac) [1-20]

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> ACETYLATION

<400> 137

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys
1 5 10 15
Arg His Arg Lys
20

<210> 138
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence
<400> 138
Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg
1 5 10 15
Asp Asn Trp Cys
20

<210> 139
<211> 103
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> H4 [1-103]
<400> 139
Met Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala
1 5 10 15
Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg Asp Asn Ile Gln Gly Ile Thr Lys
20 25 30
Pro Ala Ile Arg Arg Leu Ala Arg Arg Gly Gly Val Lys Arg Ile Ser
35 40 45
Gly Leu Ile Tyr Glu Glu Thr Arg Gly Val Leu Lys Val Phe Leu Glu
50 55 60
Asn Val Ile Arg Asp Ala Val Thr Tyr Thr Glu His Ala Lys Arg Lys
65 70 75 80
Thr Val Thr Ala Met Asp Val Val Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg
85 90 95

Thr Leu Tyr Gly Phe Gly Gly

100

<210> 140

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 140

Cys Lys Ala Thr Gln Ala Ser Gln Glu Tyr

1 5 10

<210> 141

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 141

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Cys

20

<210> 142

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H3 [1-18 WC]

<400> 142

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Trp Cys

20

<210> 143

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 143

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly Cys
1 5 10

<210> 144

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H4 [8-25 WC]

<400> 144

Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg
1 5 10 15

Asp Asn Trp Cys
20

<210> 145

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 145

Met Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala
1 5 10 15

Pro Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Val Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala
20 25 30

Thr Gly Gly Val Lys Lys Pro His Arg Tyr Arg Pro Gly Thr Val Ala
35 40 45

Leu Arg Glu Ile Arg Arg Tyr Gln Lys Ser Thr Glu Leu Leu Ile Arg
50 55 60

Lys Leu Pro Phe Gln Arg Leu Met Arg Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys
65 70 75 80

Thr Asp Leu Arg Phe Gln Ser Ser Ala Val Met Ala Leu Gln Glu Ala
85 90 95

Cys Glu Ser Tyr Leu Val Gly Leu Phe Glu Asp Thr Asn Leu Cys Val
100 105 110

Ile His Ala Lys Arg Val Thr Ile Met Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala
115 120 125

Arg Arg Ile Arg Gly Glu Arg Ala
130 135

<210> 146

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 146

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 147

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PLR10

<400> 147

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 148

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C

<400> 148

Ser Asn Arg Trp Leu Asp Val Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25

<210> 149

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N

<400> 149

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg

20 25 30

<210> 150

<211> 32

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C

<400> 150

Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

20 25 30

<210> 151

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1

<400> 151

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu

20 25

<210> 152

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C

<400> 152

Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

20 25

<210> 153

<211> 29

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2

<400> 153

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met

20 25

<210> 154

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2

<400> 154

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Ala Ala Gln Glu Glu

20 25

<210> 155

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N

<400> 155

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Thr Ser Val Gly Lys Tyr Pro Asn Thr Gly Tyr Tyr Gly

20 25 30

Asp

<210> 156

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C

<400> 156

Thr Ser Val Gly Lys Tyr Pro Asn Thr Gly Tyr Tyr Gly Asp Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

20 25 30

Arg

<210> 157

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N

<

400> 157

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr

20 25 30

<210> 158

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C

<400> 158

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

20 25 30

<210> 159

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PLK10_PEG22

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> PEG22

<400> 159

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Xaa

1 5 10

<210> 160

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N

<400> 160

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Met Ile Ala Ser Gln Phe Leu Ser Ala Leu Thr Leu Val

20 25 30

Leu Leu Ile Lys Glu Ser Gly Ala

35 40

<210> 161

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_C

<400> 161

Met Ile Ala Ser Gln Phe Leu Ser Ala Leu Thr Leu Val Leu Leu Ile

1 5 10 15

Lys Glu Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg

20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

35 40

<210> 162

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N

<400> 162

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Glu Lys Phe Ile Leu Lys Val Arg Pro Ala Phe Lys Ala

20 25 30

Val

<210> 163

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EPOR_mEPO_6R_N

<400> 163

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr

1 5 10 15

Trp Val Cys Lys Pro Gln Gly Gly

20

<210> 164

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EPOR_mEPO_6R_C

<400> 164

Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys Pro Gln

1 5 10 15

Gly Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg

20

<210> 165

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TfR_TfTP_6R_N

<400> 165

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val

1 5 10 15

Trp Pro

<210> 166

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TfR_TfTP_6R_C

<400> 166

Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg

<210> 167

<211> 167

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target polypeptide SCF

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Cationic anchoring domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (167)..(167)

<223> Cationic anchoring domain

<400> 167

Xaa Met Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp
1 5 10 15

Val Thr Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu
20 25 30

Lys Tyr Val Pro Gly Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser
35 40 45

Glu Met Val Val Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys
50 55 60

Phe Ser Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys
65 70 75 80

Leu Val Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser
85 90 95

Ser Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe
100 105 110

Thr Pro Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe
115 120 125

Lys Asp Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser
130 135 140

Thr Leu Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe
145 150 155 160

Met Leu Pro Pro Val Ala Xaa
165

<210> 168

<211> 194

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting polypeptide CD70

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Cationic anchoring domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (194)..(194)

<223> Cationic anchoring domain

<400> 168

Xaa Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly
1 5 10 15

Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile
20 25 30

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu
35 40 45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His
50 55 60

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala
65 70 75 80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu
85 90 95

Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu
100 105 110

Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu
115 120 125

Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg
130 135 140

Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro
145 150 155 160

Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
180 185 190

Pro Xaa

<210> 169

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting polypeptide SH2D1A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Cationic anchoring domain

<400> 169

Xaa Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met Asp Ala Val Ala
1 5 10 15

Val Tyr His Gly Lys Ile Ser Arg Glu Thr Gly Glu Lys Leu Leu Leu
20 25 30

Ala Thr Gly Leu Asp Gly Ser Tyr Leu Leu Arg Asp Ser Glu Ser Val
35 40 45

Pro Gly Val Tyr Cys Leu Cys Val Leu Tyr His Gly Tyr Ile Tyr Thr
50 55 60

Tyr Arg Val Ser Gln Thr Glu Thr Gly Ser Trp Ser Ala Glu Thr Ala
65 70 75 80

Pro Gly Val His Lys Arg Tyr Phe Arg Lys Ile Lys Asn Leu Ile Ser
85 90 95

Ala Phe Gln Lys Pro Asp Gln Gly Ile Val Ile Pro Leu Gln Tyr Pro
100 105 110

Val Glu Lys Lys Ser Ser Ala Arg Ser Thr Gln Gly Thr Thr Gly Ile
115 120 125

Arg Glu Asp Pro Asp Val Cys Leu Lys Ala Pro
130 135

<210> 170

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETYLATION

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Aib

<400> 170

Ser Asn Tyr Ser Xaa Ala Asp Lys Xaa Ala Asn Xaa Ala Asp Asp Xaa
1 5 10 15

Ala Glu Xaa Ala Lys Glu Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
35 40

<210> 171

<211> 143

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting polypeptide SH2D1A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Cationic anchoring domain

<400> 171

Met Gly Ser Ser Xaa Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met
1 5 10 15

Asp Ala Val Ala Val Tyr His Gly Lys Ile Ser Arg Glu Thr Gly Glu
20 25 30

Lys Leu Leu Leu Ala Thr Gly Leu Asp Gly Ser Tyr Leu Leu Arg Asp
35 40 45

Ser Glu Ser Val Pro Gly Val Tyr Cys Leu Cys Val Leu Tyr His Gly
50 55 60

Tyr Ile Tyr Thr Tyr Arg Val Ser Gln Thr Glu Thr Gly Ser Trp Ser
65 70 75 80

Ala Glu Thr Ala Pro Gly Val His Lys Arg Tyr Phe Arg Lys Ile Lys
85 90 95

Asn Leu Ile Ser Ala Phe Gln Lys Pro Asp Gln Gly Ile Val Ile Pro
100 105 110

Leu Gln Tyr Pro Val Glu Lys Lys Ser Ser Ala Arg Ser Thr Gln Gly
115 120 125

Thr Thr Gly Ile Arg Glu Asp Pro Asp Val Cys Leu Lys Ala Pro
130 135 140

<210> 172

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Siglec

<400> 172

Ser Asn Arg Trp Leu Asp Val Lys

1 5

<210> 173

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2 peptide

<400> 173

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr

1 5 10

<210> 174

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 peptide

<400> 174

Thr Ser Val Gly Lys Tyr Pro Asn Thr Gly Tyr Tyr Gly Asp

1 5 10

<210> 175

<211> 14

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> SCF peptide

<400> 175

Glu Lys Phe Ile Leu Lys Val Arg Pro Ala Phe Lys Ala Val

1 5 10

<210> 176

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Kit peptide

<400> 176

Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val Asn Ile Val Asp Asp Leu

1 5 10 15

Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser

20

<210> 177

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Kit peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETYLATION

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Aib

<400> 177

Ser Asn Tyr Ser Xaa Ala Asp Lys Xaa Ala Asn Xaa Ala Asp Asp Xaa

1 5 10 15

Ala Glu Xaa Ala Lys Glu Asn Ser

20

<210> 178

<211> 263

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Family B GPCR fragment

<400> 178

His Cys Thr Arg Asn Ala Ile His Ala Asn Leu Phe Ala Ser Phe Val

1 5 10 15

Leu Lys Ala Ser Ser Val Leu Val Ile Asp Gly Leu Leu Arg Thr Arg

20 25 30

Tyr Ser Gln Lys Ile Gly Asp Asp Leu Ser Val Ser Thr Trp Leu Ser

35 40 45

Asp Gly Ala Val Ala Gly Cys Arg Val Ala Ala Val Phe Met Gln Tyr

50 55 60

Gly Ile Val Ala Asn Tyr Cys Trp Leu Leu Val Glu Gly Leu Tyr Leu

65 70 75 80

His Asn Leu Leu Gly Leu Ala Thr Leu Pro Glu Arg Ser Phe Phe Ser

85 90 95

Leu Tyr Leu Gly Ile Gly Trp Gly Ala Pro Met Leu Phe Val Val Pro

100 105 110

Trp Ala Val Val Lys Cys Leu Phe Glu Asn Val Gln Cys Trp Thr Ser

115 120 125

Asn Asp Asn Met Gly Phe Trp Trp Ile Leu Arg Phe Pro Val Phe Leu

130 135 140

Ala Ile Leu Ile Asn Phe Phe Ile Phe Val Arg Ile Val Gln Leu Leu

145 150 155 160

Val Ala Lys Leu Arg Ala Arg Gln Met His His Thr Asp Tyr Lys Phe

165 170 175

Arg Leu Ala Lys Ser Thr Leu Thr Leu Ile Pro Leu Leu Gly Val His

180 185 190

Glu Val Val Phe Ala Phe Val Thr Asp Glu His Ala Gln Gly Thr Leu

195 200 205

Arg Ser Ala Lys Leu Phe Phe Asp Leu Phe Leu Ser Ser Phe Gln Gly

210 215 220

Leu Leu Val Ala Val Leu Tyr Cys Phe Leu Asn Lys Glu Val Gln Ser

225 230 235 240

Glu Leu Arg Arg Arg Trp His Arg Trp Arg Leu Gly Lys Val Leu Trp

245 250 255

Glu Glu Arg Asn Thr Ser Asn

260

<210> 179

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF fragment

<400> 179

Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe
1 5 10 15

Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys
20 25 30

Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val
35 40 45

Val Ser Ile Lys Gly Val Ser Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu
50 55 60

Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Ser Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe
65 70 75 80

<210> 180

<211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 180

Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe
1 5 10 15

Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys
20 25 30

Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val
35 40 45

Val Ser Ile Lys Gly Val Ser Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu
50 55 60

Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Ser Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe
65 70 75 80

Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys
85 90 95

Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu
100 105 110
Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met
115 120 125

Ser Ala Lys Ser
130

<210> 181
<211> 52
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> FGF fragment
<400> 181
Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys
1 5 10 15
Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu
20 25 30
Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met
35 40 45

Ser Ala Lys Ser
50

<210> 182
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Cathepsin B proteolytic cleavage domain
<400> 182
Phe Lys Phe Leu
1

<210> 183
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Cathepsin D proteolytic cleavage domain

<400> 183

Arg Gly Phe Phe Pro

1 5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2 receptor peptide

<400> 184

Cys Asp Asp Asp Met Leu Asn Cys Glu

1 5

<210> 185

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 antibody peptide

<400> 185

Thr Gly Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp

1 5 10

<210> 186

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SCFN

<400> 186

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys

20 25 30

Asp Val Thr Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys

35 40

<210> 187

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cKit peptide plus anchor and linker

<400> 187

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val Asn Ile Val

20 25 30

Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser

35 40

<210> 188

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full anchor-linker-KIT7194_AIB1 construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(35)

<223> Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> Aib

<400> 188

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Asn Tyr Ser Xaa Ala Asp Lys Xaa Ala Asn Xaa Ala

20 25 30

Asp Asp Xaa Ala Glu Xaa Ala Lys Glu Asn Ser

35 40